

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2001-503760

(P2001-503760A)

(43) 公表日 平成13年3月21日 (2001.3.21)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 H 21/00		C 0 7 H 21/00	
C 1 2 M 1/00		C 1 2 M 1/00	A
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 Q 1/68	A
C 1 2 Q 1/68		G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53		33/566	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 189 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願平10-521765  
 (86) (22) 出願日 平成9年11月6日 (1997. 11. 6)  
 (85) 翻訳文提出日 平成11年4月30日 (1999. 4. 30)  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 7 / 2 0 1 9 5  
 (87) 国際公開番号 W O 9 8 / 2 0 0 2 0  
 (87) 国際公開日 平成10年5月14日 (1998. 5. 14)  
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 7 4 6 , 0 5 5  
 (32) 優先日 平成8年11月6日 (1996. 11. 6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)  
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 7 8 6 , 9 8 8  
 (32) 優先日 平成9年1月23日 (1997. 1. 23)  
 (33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 シークエノム・インコーポレーテッド  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92121、  
 サン・ディエゴ、ソレント・バリー・ロー  
 ド・11555  
 (72) 発明者 オドネル, マリアン・ジエイ  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92122、  
 サン・ディエゴ、ノベル・ドライブ・3855  
 (72) 発明者 キャンター, チャールズ・アール  
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ・  
 02215、ボストン、ベイ・ステイト・ロー  
 ド・11  
 (74) 代理人 弁理士 川口 義雄 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 核酸の高密度固定化

## (57) 【要約】

核酸の質量分析による検出のために特に有用である、不溶性表面上に高密度の核酸を固定化する方法及びキットを開示する。固定化核酸を含むアレー、並びに (化学的及び酵素的) 核酸合成、ハイブリタイゼーション及び/または配列決定を含めた各種固相核酸化学用途での固定化核酸の使用が提供される。更に、サブストレート表面上にサンプル材料のマルチエレメントアレーを作成するために特定容量の流体を送達することができる連続及び並行分配ツールが提供される。本発明のツールは、複数のベシクル要素またはピンのアセンブリを含み、各ピンはナノリッター容量の流体を保持するために適した狭い内部チャンバを含み得る。サブストレート表面上にサンプル材料のマルチエレメントアレーを作成するために使用することができるツールを分配する方法も提供される。前記ツールは、ピンから流体をスプレーすることにより、サブストレート表面を接触させることにより、またはサブストレート表面に当たる液滴を形成することによりサブストレート表面に対して流体スポットを分配することができる。前記ツールは、サンプルアレーを形成

するためにサブストレート表面上の異なる位置にピンを移動させながら一連のステップでサンプル材料を分配することによりサンプル材料のアレーを形成することができる。作成されたサンプルアレーは、質量分析法による分析のためのサンプルアレーを配置するプレートアセンブリに移動させ得る。

## 【特許請求の範囲】

1. 共有結合が形成されるような条件下でチオール含有核酸をチオール反応性基を含む不溶性支持体と反応させて、前記不溶性支持体上に核酸を固定化することを特徴とする方法。
2. 前記反応を約25〜約100℃の温度で実施することを特徴とする請求の範囲第1項に記載の方法。
3. 更に、不溶性支持体をチオール反応性架橋剤と反応させてチオール反応性固体支持体を形成するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の方法。
4. 前記チオール反応性架橋剤がN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)であることを特徴とする請求の範囲第3項に記載の方法。
5. 不溶性支持体上に核酸を固定化する方法であって、  
共有結合が形成されるような条件下でチオール含有不溶性支持体をチオール反応性基を含む核酸と反応させて、前記不溶性支持体上に核酸を固定化することを特徴とする前記方法。
6. 更に、前記不溶性支持体をチオール含有試薬で修飾する

ことによりチオール含有の不溶性支持体を形成するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第5項に記載の方法。

7. 核酸を含む不溶性支持体であって、核酸が少なくとも1つの硫黄原子を介して前記不溶性支持体の表面に共有結合していることを特徴とする前記不溶性支持体。
8. 核酸を含む不溶性支持体であって、核酸が少なくとも20 fmol/μm<sup>2</sup>の密度で前記不溶性支持体の表面に共有結合していることを特徴とする前記不溶性支持体。
9. i) チオール反応性架橋剤及びii) 前記チオール反応性架橋剤と反応し得る官能基で表面を修飾するための表面修飾剤を含むことを特徴とするキット。
10. 前記表面修飾剤がチオール部分を含まないことを特徴とする請求の範囲

すことを特徴とする請求の範囲第14項に記載の方法。

16. 前記チオール含有核酸を、  
流体を移すのに適したベシクルを用意し、  
前記ベシクルを前記サブストレート表面上の第1位置に近接して配置し、  
前記サブストレート表面の第1位置に、ある容量の流体を送達させるために前記ベシクルをコントロールし、  
前記ベシクルをサブストレート上の前記1組の位置に移動させ、  
前記1組の位置の各位置で流体を送達させることからなるプロセスに従って前記1組の位置で不溶性サブストレートの表面

と接触させ、前記流体がチオール含有核酸を含むことを特徴とする請求の範囲第13項に記載の方法。

17. サブストレート表面上に核酸のアレーを作成する方法であって、  
サブストレート表面を3-アミノプロピルトリエトキシシランの溶液と反応させて、前記サブストレート表面上に第1級アミンの均一層を形成し、  
前記第1級アミンの均一層をN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)の溶液と反応させることにより前記サブストレートの表面をヨードアセトアミド官能基で誘導化し、  
前記サブストレート上の1組の位置をチオール含有核酸と接触させて、前記チオール含有核酸を前記1組の位置の各位置でサブストレート表面上に固定化することを特徴とする前記方法。

18. 前記チオール含有核酸を、  
流体を移すためにベシクルまたはベシクルのアレーを用意し、  
前記ベシクルまたはベシクルのアレーをサブストレート表面上の第1位置又は複数の位置に近接して配置し、  
前記サブストレート表面上の第1位置又は複数の位置に、あ

る容量の流体を送達するために前記ベシクルまたはベシクルのアレーをコントロールし、

第9項に記載のキット。

11. 更に、前記表面修飾剤と反応性の表面を有する不溶性支持体を含むことを特徴とする請求の範囲第9項に記載のキット。
12. チオール部分を有する支持体の表面を修飾するための試薬及び支持体のチオール部分と反応し得るチオール反応性架橋剤を含むことを特徴とするキット。

13. サブストレート表面上に核酸のアレーを形成する方法であって、  
チオール含有核酸を、その表面上に規則正しく配列した複数位置に位置するチオール反応性基を含む不溶性支持体の表面と接触させて、核酸のアレーをサブストレート表面上に形成することを特徴とする前記方法。

14. 前記支持体表面上のチオール反応性基を、  
流体を移すためにベシクルまたはベシクルのアレーを用意し、  
前記ベシクルまたはベシクルのアレーをサブストレート表面上の第1位置又は複数の位置に近接して配置し、

前記サブストレート表面上の第1位置又は複数の位置に、ある容量の流体を送達するために前記ベシクルまたはベシクルのアレーをコントロールし、

前記ベシクルをサブストレート上の1組の位置に移動させ、

前記1組の位置の各位置で流体を送達することを含むプロセスにより生成させ、前記流体はチオール反応性基を生成する際に使用される溶液を含むことを特徴とする請求の範囲第13項に記載の方法。

15. 前記溶液が、前記サブストレート表面上の前1組の位

置で第1級アミンを生成させるために3-アミノプロピルトリエトキシシランを含有する第1溶液と前記サブストレート表面を前記1組の位置でヨードアセトアミド官能基で誘導化するためにN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)を含有する第2溶液とを含み、

前記第1溶液をまず前記1組の位置の各位置に別々に送達し、次いで前記第2溶液を前記1組の位置の各位置に別々に送達させるように前記プロセスを繰り返

す前記ベシクルまたはベシクルのアレーを前記1組の位置に移動させ、

前記1組の位置の各位置で流体を送達することを含むプロセスに従ってサブストレート上の前記1組の位置で接触させ、前記流体がチオール含有核酸を含むことを特徴とする請求の範囲第17項に記載の方法。

19. 請求の範囲第13項に記載の方法により作成される核酸のアレー。
20. 固定化前に、前記プロセスは、オリゴヌクレオチドプライマーが3'-または5'-ジスルフィド結合を含む反応で核酸を増幅させ、増幅させた核酸の1つの鎖の3'-または5'-ジスルフィド結合を還元してチオール含有核酸を生成させることを含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の方法。

21. 前記固定化を、  
前記不溶性支持体の表面を3-アミノプロピルトリエトキシシランを含む溶液と反応させて、前記不溶性支持体の表面上に第1級アミンの均一層を形成し、

前記第1級アミンの均一層をN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)の溶液と反応させることにより前記不溶性支持体の表面をヨードアセトアミド官能基で誘導化し、

前記支持体の表面を核酸のチオール含有鎖と接触させて、チオール含有核酸のチオール基と支持体表面上のヨードアセトアミド官能基との間の共有結合により前記チオール含有核酸をサブストレート表面上に固定化することにより行うことを特徴とする請求の範囲第20項に記載の方法。

22. 更に、  
前記の固定化したチオール含有核酸の一部に相補的な一本鎖核酸をハイブリダイズし、  
前記サブストレート表面にマトリックス材料を添加して、固定化したハイブリッドを結晶化し、

ハイブリダイズした一本鎖核酸の分子量を質量分析を用いて測定して、増幅させた核酸標的を検出することを含むことを特徴とする請求の範囲第20項に記載の方法。

23. 核酸標的を検出する方法であって、

サブストレート表面を3-アミノプロピルトリエトキシシラン

ンの溶液と反応させて、前記サブストレート表面上に第1級アミンの均一層を形成し、

前記第1級アミンの均一層をN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(S1AB)の溶液と反応させることにより前記サブストレート表面をヨードアセトアミド官能基で誘導化し、

1つ以上の核酸標的分子を、1つのオリゴヌクレオチドプライマーが3'-または5'-ジスルフィド結合を含むオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅させ、

増幅させた核酸配列の1つの鎖の3'-または5'-ジスルフィド結合を還元して遊離チオール基を生成し、

増幅させた核酸標的配列を変性させ、

前記サブストレート表面を核酸のチオール含有鎖と接触させて、チオール含有核酸鎖のチオール基とサブストレート表面に対して誘導化したヨードアセトアミド官能基との間の共有結合により前記チオール含有核酸をサブストレート表面に固定化し、

固定化したチオール含有核酸の一部に相補的な一本鎖核酸をハイブリダイズし、

前記サブストレート表面にマトリックス材料を添加し、

ハイブリダイズした一本鎖核酸の分子量を質量分析を用いて測定することを特徴とする前記方法。

24. 前記質量分析法が、マトリックスによるレーザー脱離/イオン化、飛行時間型(MALDI-TOF)分析、エレクトロスプレー(ES)、イオンサイクロトロン共鳴(ICR)及びフーリエ変換からなる群から選択されることを特徴とする請求の範囲第22項に記載の方法。

25. 前記チオール含有核酸をサブストレート表面上にアレーの形態で固定化することを特徴とする請求の範囲第22項に記載の方法。

31. 前記質量分析法が、マトリックスによるレーザー脱離/イオン化、飛行時間型(MALDI-TOF)分析、エレクトロスプレー(ES)、イオンサイクロトロン共鳴(ICR)及びフーリエ変換からなる群から選択されることを特徴とする請求の範囲第30項に記載の方法。

32. 更に、

固定化したチオール含有核酸の一部に相補的な一本鎖核酸をハイブリダイズし、

ハイブリダイズした一本鎖核酸の3'-末端に少なくとも1つのデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドを酵素的核酸合成により付加し、

前記支持体表面にマトリックス材料を添加して、固定化したハイブリッドを結晶化し、

ハイブリダイズした一本鎖核酸の分子量を質量分析を用いて測定して、前記支持体表面上の核酸の配列を決定することを含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の方法。

33. 支持体表面上の核酸を配列決定する方法であって、

支持体表面を3-アミノプロピルトリエトキシシランの溶液と反応させて前記支持体表面上に第1級アミンの均一層を形成し、

前記第1級アミンの均一層をN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(S1AB)の溶液と反応させることにより前記支持体表面をヨードアセトアミド官能基で誘導化し、

前記支持体表面を核酸のチオール含有鎖と接触させて、チオール含有核酸鎖のチオール基と支持体表面上で誘導化したヨードアセトアミド官能基との間の共有結合により前記チオール含有核酸を前記支持体表面上に固定化し、

固定化したチオール含有核酸の一部に相補的な一本鎖核酸をハイブリダイズし、

1つ以上のジデオキシヌクレオチドの存在下で核酸合成を実施して、ハイブリダイズした一本鎖核酸の3'-末端に少なくとも1つのデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドを酵素的核酸合成により付加し、

26. 更に、

固定化したチオール含有核酸の一部に相補的な一本鎖核酸をハイブリダイズし、

ハイブリダイズした一本鎖核酸の3'-末端に少なくとも1つのヌクレオチドを核酸合成により付加して、核酸を表面上で合成することを特徴とする請求の範囲第1項に記載の方法。

27. 支持体表面上で核酸を合成する方法であって、

支持体表面を3-アミノプロピルトリエトキシシランの溶液と反応させて、前記サブストレート表面上に第1級アミンの均

一層を形成させ、

前記第1級アミンの均一層をN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(S1AB)の溶液と反応させることにより前記支持体表面をヨードアセトアミド官能基で誘導化し、

前記支持体表面を核酸のチオール含有鎖と接触させて、チオール含有核酸鎖のチオール基と前記表面上のヨードアセトアミド官能基との間の共有結合により前記チオール含有核酸を支持体表面上に固定化し、

固定化したチオール含有核酸の一部に相補的な一本鎖核酸をハイブリダイズし、

ハイブリダイズした一本鎖核酸の3'-末端に少なくとも1つのヌクレオチドを核酸合成により付加して、核酸を前記表面上で合成することを特徴とする前記方法。

28. 前記固定化核酸をアレーの形態で前記支持体上に配置することを特徴とする請求の範囲第27項に記載の方法。

29. 更に、核酸合成中に1つ以上のジデオキシヌクレオシドトリホスフェートを付加することを含むことを特徴とする請求の範囲第27項に記載の方法。

30. 更に、合成した一本鎖核酸の分子量を質量分析法により測定することを含むことを特徴とする請求の範囲第27項に記載の方法。

前記支持体表面にマトリックス材料を添加し、

ハイブリダイズした一本鎖核酸の分子量を質量分析により測定することを含むことを特徴とする前記方法。

34. 前記質量分析法が、マトリックスによるレーザー脱離/イオン化、飛行時間型(MALDI-TOF)分析、エレクトロスプレー(ES)、イオンサイクロトロン共鳴(ICR)及びフーリエ変換からなる群から選択されることを特徴とする請求の範囲第32項に記載の方法。

35. 固定化核酸が支持体上にアレーの形態で配置されることを特徴とする請求の範囲第32項に記載の方法。

36. サブストレート表面を3-アミノプロピルトリエトキシシランの溶液と反応させて前記支持体表面上に第1級アミンの均一層を形成し、

前記第1級アミンの均一層をN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(S1AB)の溶液と反応させることにより前記サブストレート表面をヨードアセトアミド官能基で誘導化し、

前記サブストレート表面をチオール含有核酸と接触させて、チオール含有核酸のチオール基とサブストレート表面に対して誘導化したヨードアセトアミド官能基との間の共有結合により前記

チオール含有核酸を前記サブストレート表面上に該表面の所定の1組の位置で固定化することを含むプロセスにより作成される、固定化核酸のアレーを含むサブストレート。

37. 核酸を前記支持体上にアレーの形態で配置されることを特徴とする請求の範囲第7項に記載の不溶性支持体。

38. 核酸を前記支持体上にアレーの形態で配置されることを特徴とする請求の範囲第8項に記載の不溶性支持体。

39. 請求の範囲第17項に記載の方法により作成されることを特徴とする核酸のアレー。

40. 前記支持体がシリコンであることを特徴とする請求の範囲第1項に記載

の方法。

41. サブストレート表面に対して化学的または生物学的手法でナノリッター容量の流体を分配するための分配装置であって、

複数の側面と複数の孔が形成されてなる底部部分とを有し、前記側面と前記底部部分により内部が規定されているハウジング、

前記孔内に取り付けられており、ナノリッター容量の流体を保持するためにナノリッター容量の大きさの流体保持チャンバ

を有している1つ以上の流体通過ベシクルであって、前記流体保持チャンバが前記ハウジング内部と流体連通して配置されている前記流体通過ベシクル、及び

流体を前記ベシクルの流体保持チャンバに充填したときにナノリッター容量の大きさの流体通過ベシクルからナノリッター容量の流体を選択的に分配するために前記ハウジング内部と連通している分配手段

を含み、前記装置がサブストレート上に位置合わせして配置されたときに前記分配手段がサブストレート表面に対してナノリッター容量の流体を分配することを特徴とする前記分配装置。

42. 前記した各流体通過ベシクルは近位開放端部と前記孔内に取り付けられたときに前記ハウジングの底部部分を越えて延びている遠位チップ部分とを有し、前記近位開放端部は孔内に取り付けられたときにハウジング内部と流体連通して前記流体保持チャンバを配置していることを特徴とする請求の範囲第41項に記載の装置。

43. 前記した複数の流体通過ベシクルが前記ハウジングの孔内に取外し自在且つ取替え自在に取り付けられていることを特徴とする請求の範囲第41項に記載の装置。

44. 前記した複数の流体通過ベシクルが前記ハウジング内にベシクルを固定的に取り付けるためのグルーシールを含むことを特徴とする請求の範囲第41項に記載の装置。

45. 前記流体保持チャンバが、毛管作用により流体を満たすのに寸法的に適

の範囲第54項に記載の装置。

56. 前記ハウジングが更に頂部部分を含み、更に前記ハウジング頂部部分をハウジング底部部分に固定するための固定手段を含むことを特徴とする請求の範囲第41項に記載の装置。

57. 前記固定手段が、前記ハウジングの頂部部分及び底部部分の1つに形成された複数のファスナ受容孔と前記ハウジングの頂部部分及び底部部分を一緒に固定するために前記孔内に取り付けるための複数のファスナとを含むことを特徴とする請求の範囲第56項に記載の装置。

58. 前記分配手段が、特定圧力条件下で前記ハウジング内部を処置するために前記ハウジング内部に流動的に連結した圧力源を含むことを特徴とする請求の範囲第41項に記載の装置。

59. 前記流体通過ベシクルが毛管作用により満たされ、前記分配手段が更に異なる圧力条件下でハウジングの内部を処置するために圧力源を変更する手段を含み、この圧力源変更手段が各ベシクルの流体保持チャンバを所定流量に相当する所定高さまで満たすために毛管作用を補償するに十分な特定圧力条件下でハウジング内部を処置することを特徴とする請求の範囲第58項に記載の装置。

60. 前記圧力源変更手段が更に特定ナノリッター容量の流体を前記した各ベシクルのチャンバから選択的に排出させるための流体選択手段を含むことを特徴とする請求の範囲第59項に記載の装置。

61. 前記流体通過ベシクルが前記ハウジングの内部に対して開放した近位端部を有し、前記ベシクルの流体保持チャンバが該近位開放端部でメニスカスを形成することなく毛管作用により流体で実質的に完全に満たされる大きさを有していることを特徴とする請求の範囲第41項に記載の装置。

62. 前記分配手段が各ベシクルの流体保持チャンバから分配される流体の量を選択的に変化させるための流体選択手段を含むことを特徴とする請求の範囲第41項に記載の装置。

63. 複数のベシクルを含み、その第1部分は第1の大きさの流体保持チャンバを含み、第2部分は第2の大きさの流体保持チャンバを含み、これにより複数の

合した狭い径を含むことを特徴とする請求の範囲第41項に記載の装置。

46. 前記した複数の流体通過ベシクルの各流体保持チャンバが、毛管作用により流体で実質的に完全に満たされる大きさを有していることを特徴とする請求の範囲第41項に記載の装置。

47. 前記した複数の流体通過ベシクルが流体送達ニードルのアレーからなることを特徴とする請求の範囲第41項に記載の装置。

48. 前記流体送達ニードルが金属から製造されていることを特徴とする請求の範囲第47項に記載の装置。

49. 前記流体送達ニードルがガラスから製造されていることを特徴とする請求の範囲第47項に記載の装置。

50. 前記流体送達ニードルがシリカから製造されていることを特徴とする請求の範囲第47項に記載の装置。

51. 前記流体送達ニードルがポリマー材料から製造されていることを特徴とする請求の範囲第47項に記載の装置。

52. 前記流体通過ベシクルの数がマルチウェルサブストレートのウェルの数に等しいかもしくはそれより少ないことを特徴とする請求の範囲第41項に記載の装置。

53. 前記ハウジングが更に頂部部分を含み、更に複数の流体通過ベシクルを機械的に偏移させて前記ハウジングの底部部分とシール接触させる機械的偏移手段をも含むことを特徴とする請求の範囲第41項に記載の装置。

54. 前記した各流体通過ベシクルがフランジを含む近位端部部分を有し、更にハウジング内部と外部環境との間にシールを形成するために前記フランジと前記ハウジング底部部分の内表面との間に配置されるシーラー要素を含むことを特徴とする請求の範囲第53項に記載の装置。

55. 前記機械的偏移手段が複数のスプリング要素を含み、前記した各スプリング要素の一端は前記した各流体通過ベシクルの近位端部に、他端は前記ハウジング頂部の内面に連結しており、前記スプリング要素はシールを形成するために前記ベシクルの近位端部に機械的偏移力を加えることを特徴とする請求

の流体容量が分配され得ることを特徴とする請求の範囲第41項に記載の装置。

64. 前記流体選択手段が前記ハウジングに連結しており、特定圧力条件下で前記ハウジング内部を処置するために前記ハウジング内部と連通している圧力源、及び

前記圧力源に連結した、前記した各流体通過ベシクルの流体チャンバから分配される流体の量を変化させるべく該流体通過ベシクルの流体チャンバに正圧を加えるために前記ハウジング内部の圧力を変化させる調節手段を含むことを特徴とする請求の範囲第42項に記載の装置。

65. マルチウェルサブストレートの1つ以上のウェルに対して化学的または生物学的手法で流体を分配するための流体分配装置であって、

複数の側面と複数の孔が形成されてなる底部部分とを有し、前記側面と前記底部により内部が規定されているハウジング、前記孔内に取り付けられている、前記ハウジングの内部に連通して配置された流体保持チャンバを有する複数の流体通過ベシクル、及び

前記ハウジング内部と連通している、1組の複数の流体通過ベシクルから分配されるべく前記ベシクルの流体保持チャンバに供給される流体の量を自由に選択するための流体容量選択・分配手段

を含み、前記装置がサブストレート上に位置合わせして配置されたときに前記分配手段がマルチウェルサブストレートのウェ

ルに特定量の流体を分配することを特徴とする前記流体分配装置。

66. 前記流体容量選択・分配手段が前記1組のベシクルから分配される流体の量を選択するように適合されることを特徴とする請求の範囲第65項に記載の流体分配装置。

67. 前記流体容量選択・分配手段が特定圧力条件下で前記ハウジング内部を処置するために前記ハウジング内部と流動的に連結した圧力源を含むことを特徴とする請求の範囲第65項に記載の流体分配装置。

68. 更に、前記流体通過ベシクルから分配される流体の量を選択するために

ハウジング内部の圧力を変更する手段を含むことを特徴とする請求の範囲第67項に記載の流体分配装置。

69. 前記流体通過ベシクルが毛管作用により流体で満たされ、更に異なる圧力条件下でハウジング内部を処置するために圧力源を変更する手段を含む、この圧力源変更手段が、各ベシクルの流体保持チャンバを所定流量に相当する所定高さまで満たすために毛管作用を補償するに十分な圧力条件下でハウジング内部を処置することを特徴とする請求の範囲第67項に記載の流体分配装置。

70. 前記流体選択手段が、

前記ハウジングに連結し、特定圧力条件下で前記ハウジング内部を処置するために前記ハウジング内部に連通している圧力源、及び

前記圧力源に連結した、前記した各流体通過ベシクルの流体保持チャンバから分配される流体の量を変化させるべく該流体通過ベシクルの流体保持チャンバに正圧を加えるために前記ハウジング内部の圧力を変化させる調節手段を含むことを特徴とする請求の範囲第65項に記載の流体分配装置。

71. マルチウェルサブストレートの1つ以上のウェルに対して化学的または生物学的手法で流体を分配するための流体分配装置であって、

複数の側面と頂部部分と複数の孔が形成されてなる底部部分とを有し、前記側面、前記頂部部分及び前記底部部分により内部が規定されているハウジング、

前記孔内に取り付けられた、前記ハウジング内部に流体連通して配置されたナノリッター容量の流体を保持するための大きさの流体保持チャンバを有する複数の流体通過ベシクル、及び

前記した複数の通過ベシクルを機械的に偏移させて前記ハウ

ジングの底部部分とシール接触させるための機械的偏移手段を含むことを特徴とする前記流体分配装置。

72. 前記した各流体通過ベシクルがフランジを含む近位端部分を有し、更に内部と外部環境との間に圧力及び流体シールを形成するために前記フランジと前記ハウジング底部部分の内面との間に配置されるシーラー要素を含むことを特

徴を含み、この圧力源変更手段が、各ベシクルの流体保持チャンバを所定流量に相当する所定高さまで満たすために毛管作用を補償するに十分な特定圧力条件下でハウジング内部を処置することを特徴とする請求の範囲第76項に記載の流体分配装置。

81. 前記分配手段が各ベシクルの流体保持チャンバから分配される流体の量を選択的に変化させるための流体選択手段を含むことを特徴とする請求の範囲第76項に記載の流体分配装置。

82. 更に、

前記ハウジングに連結し、特定圧力条件下で前記ハウジング内部を処置するために前記ハウジング内部に連通している圧力源、及び

前記圧力源に連結した、前記した各流体通過ベシクルの流体保持チャンバから分配される流体の量を変化させるべく該流体通過ベシクルの流体保持チャンバに正圧を加えるために前記ハウジング内部の圧力を変化させる調節手段を含むことを特徴と

する請求の範囲第71項に記載の流体分配装置。

83. サブストレート表面上にサンプル材料のアレーを形成する方法であって、

流体を収容する内部チャンバを有するベシクルを用意するステップ、

前記ベシクルを前記サブストレート表面上の第1位置に近接して配置するステップ、

前記サブストレート表面の第1位置でナノリッター容量の流体を分配すべく前記流体を前記チャンバから放出させるためにベシクルをコントロールするステップ、及び

前記サブストレート表面に近接する1組の位置の各々に前記ベシクルを移動させて、サンプル材料のアレーを形成するために前記1組の位置の各位置に流体を分配するステップを含むことを特徴とする前記方法。

84. 更に、前記チャンバから放出された流体を受容するための位置を規定するためにサブストレート表面上に形成されたウェルを有するサブストレートを用

意とする請求の範囲第71項に記載の流体分配装置。

73. 前記機械的偏移手段が複数のスプリング要素を含み、前記した各スプリング要素の一端は前記した各流体通過ベシクルの近位端部に、他端は前記ハウジング頂部部分の内面に連結しており、前記スプリング要素は流体及び圧力シールを形成するために前記ベシクルの近位端部に機械的偏移力を加えることを特徴とする請求の範囲第71項に記載の流体分配装置。

74. 更に、前記ハウジング頂部部分をハウジング底部部分に固定するための固定手段を含むことを特徴とする請求の範囲第71項に記載の流体分配装置。

75. 前記固定手段が、前記ハウジングの頂部部分及び底部部分の1つに形成された複数のファスナ受容孔と前記ハウジングの頂部部分及び底部部分を一緒に固定するために前記孔内に

取り付けるための複数のファスナとを含むことを特徴とする請求の範囲第74項に記載の流体分配装置。

76. 更に、前記ハウジング内部に連通した、流体を前記流体通過ベシクルの流体保持チャンバに供給したときに前記ベシクルから流体を選択的に分配するための分配手段を含み、前記装置がサブストレート上に位置合わせして配置されたときに前記分配手段が前記マルチウェルサブストレートのウェルに流体を分配することを特徴とする請求の範囲第71項に記載の流体分配装置。

77. 前記分配手段が前記ハウジングの内部に流動的に連通している、特定の圧力条件下で前記ハウジング内部を処置するための圧力源を含むことを特徴とする請求の範囲第76項に記載の流体分配装置。

78. 前記した複数の流体通過ベシクルが取外し自在且つ取替え自在に取り付けられていることを特徴とする請求の範囲第71項に記載の流体分配装置。

79. 前記した複数の流体通過ベシクルが流体送達ニードルのアレーからなることを特徴とする請求の範囲第71項に記載の流体分配装置。

80. 前記流体通過ベシクルが毛管作用により流体で満たされ、前記分配手段が更に異なる圧力条件下でハウジング内部を処置するために圧力源を変更する手

意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

85. 更に、前記サブストレート表面上にマトリックス材料

を析出させることを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

86. 更に、前記マトリックス材料の溶媒を蒸発させるために所定時間待機するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第85項に記載の方法。

87. ナノリッター容量の流体を放出するステップが、流体を蒸発させたマトリックス材料上に前記流体を放出して前記マトリックス材料で溶解し、前記サブストレート表面上に結晶性構造物を形成させることを含むことを特徴とする請求の範囲第86項に記載の方法。

88. 分析対象材料をマトリックス材料と混合して溶液を調製し、前記溶液で前記チャンバ内部を満たすステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

89. 更に、堆積させたサンプル材料のアレーを有する前記サブストレートを、前記サンプル材料の組成を示す情報を測定する診断ツールにかけるステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

90. 前記サブストレートを診断ツールにかけるステップが、前記サブストレートを質量分析計を有する診断ツールにかける

ことを特徴とする請求の範囲第89項に記載の方法。

91. 内部チャンバを有するベシクルを用意するステップが、流体を前記チャンバを通して移動させるために圧電要素を有するベシクルを用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

92. 前記ベシクルを移動させるステップが、前記ベシクルを前記サブストレート表面を横断してラスターさせるステップを含むことを特徴とする請求の範囲第91項に記載の方法。

93. ベシクルを準備するステップが、サブストレート表面上の第1の複数位置に流体を分配するためにマトリックスに配置された複数のベシクルを有するベシクルアセンブリを用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83

項に記載の方法。

94. 前記ベシクルを移動させるステップが、ベシクルアセンブリを第1の複数位置に近接する位置に移動させるための距離を示すオフセット信号を測定するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第93項に記載の方法。

95. 前記ベシクルを移動させるステップが、前記ベシクルアセンブリを前記サブストレート表面上に移動させて、該サブ

ストレート上に放出される流体を有する位置のマトリックスを形成するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第94項に記載の方法。

96. 更に、洗浄流体を前記ベシクルのチャンバに抜き取って前記チャンバを濯ぐステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

97. 更に、前記チャンバを毛管作用で満たすために前記ベシクルを流体材料ソースと接触させるステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

98. シリコンからなるサブストレート材料を用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

99. 金属材料からなるサブストレート材料を用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

100. プラスチック材料からなるサブストレート材料を用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

101. 膜からなるサブストレートを用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

102. ポリマー材料からなるサブストレート材料を用意す

るステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

103. 金属をグラフトしたポリマーからなるサブストレート材料を用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

104. 化学的に官能化させたサブストレート材料を用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

テップを含むことを特徴とする請求の範囲第107項に記載の方法。

112. 前記質量分析を実施するステップがフーリエ変換質量分析を実施するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第107項に記載の方法。

113. サブストレート表面上にサンプル材料のアレーを形成するための装置であって、

流体を運ぶのに適当な遠位端部を有するベシクル、

前記ベシクルに取り付けられた遠位部分を有する可動性アーム、

前記ベシクルを前記サブストレート表面上の第1位置に近接して配置すべく前記アームを移動させるための及び前記サブストレート表面の第1位置でナノリッター容量の流体を与えるべく前記ベシクルをコントロールするためのコントローラ、及び前記材料の化学的組成を示す組成信号を発生させることにより前記材料を分析するための診断ツールを含む前記装置。

114. 前記ベシクルは材料の中実軸を含むことを特徴とす

る請求の範囲第113項に記載の装置。

115. 前記ベシクルは流体材料を運ぶのに適した内部チャンバを含むことを特徴とする請求の範囲第113項に記載の装置。

116. 前記ベシクルがチャンバと前記チャンバから放出するためのトランスデューサ要素とを含むことを特徴とする請求の範囲第113項に記載の装置。

117. 前記診断ツールが質量分析計を含むことを特徴とする請求の範囲第113項に記載の装置。

118. マトリックス材料を含む流体を移すのに適したベシクルを用意し、

前記ベシクルを前記サブストレート表面の第1位置に近接して配置し、

前記サブストレート表面の第1位置に、ある量の流体を送達させるために前記ベシクルをコントロールし、

前記サブストレート表面に隣接する1組の位置に前記ベシクルを移動し、前記1組の位置の各位置で流体を送達してマトリックス材料のアレーを形成することを含むプロセスにより形成されたマトリックス材料のアレーを担持した表面を有するサ

105. ビーズで官能化させたサブストレート材料を用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

106. 樹枝状材料で官能化させたサブストレート材料を用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第83項に記載の方法。

107. 材料を分析する方法であって、

前記材料を含む流体を運ぶのに適したベシクルを用意するステップ、

サブストレート表面の第1位置に近接して前記ベシクルを堆積させるステップ、

前記サブストレート表面の第1位置で特定且つ調整された容量の流体を与えるべくナノリッター容量の流体を送達するために前記ベシクルをコントロールするステップ、

前記ベシクルを前記サブストレート表面上の第2位置に近接する第2位置に移動させて、前記サブストレート表面上の位置のアレーに沿って特定且つ調整された容量の材料を分配するステップ、及び

前記アレーの各位置の材料について質量分析を実施するステップを含むことを特徴とする前記方法。

108. 前記ベシクルを用意するステップがマトリックス材料及び分析対象材料を混合して前記流体材料を調整するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第107項に記載の方法。

109. 流体を保持するのに適当な内部チャンバを有するベシクルを用意するステップ及びマトリックス材料を前記チャンバに充填し、前記位置のアレーに前記マトリックス材料を分配するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第107項に記載の方法。

110. 前記質量分析を実施するステップがマトリックスによるレーザー脱離イオン化質量分析を実施するステップを含む

ことを特徴とする請求の範囲第107項に記載の方法。

111. 前記質量分析を実施するステップが飛行時間型質量分析を実施するス

ブストレート。

119. 前記表面上に配置したウェルを有することを特徴とする請求の範囲第118項に記載のサブストレート。

120. 前記表面にビットが形成されていることを特徴とする請求の範囲第119項に記載のサブストレート。

121. 前記表面が粗な内表面を有していることを特徴とする請求の範囲第118項に記載のサブストレート。

## 核酸の高密度固定化

## 発明の背景

分子生物学及び生化学分野並びに病気の診断において、核酸ハイブリダイゼーションは特定のオリゴヌクレオチド配列を検出、分離及び分析するための強力なツールとなりつつある。通常、前記ハイブリダイゼーションアクセスは、例えば逆ドットプロット法 (Saiki, R. K., Walsh, P. S., Levenson, C. H. 及び Erlich, H. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6231 (1989)) の場合のように固体支持体上に固定化したオリゴデオキシヌクレオチドプローブを使用する。より最近、固体表面に結合させた固定化DNAプローブのアレーがハイブリダイゼーションによる配列決定 (SBH) のために開発された (Drmanac, R., Labat, I., Brunker, I. 及び Crkvenjakov, R., Genomics, 4, 114-128 (1989); Strezoska, Z., Pauneska, T., Radosavljevic, D.,

Labat, I., Drmanac, R. 及び Crkvenjakov, R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10089-10093 (1991))。SBHは固体支持体上の固定化オリゴヌクレオチドの規則アレーを使用する。未知DNAのサンプルをアレーに適用し、ハイブリダイゼーションパターンを観察し分析して、配列情報の多くの短ビットを同時に作成する。一本鎖3' -オーバーハングを含む二重らせんプローブを用いるポジショナルSBH (PBSH) と称されるSBHの改良型が開発された (Broude, N. E., Sano, T., Smith, C. L. 及び Cantor, C. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 3072-3076 (1994))。PBSH捕捉法を従来のサンガー配列決定法と組み合わせると、例えばゲル電気泳動により検出可能な配列決定用ラダーを作成することが可能である (Fu, D., Broude, N. E., Kester,

niques, 17, 516-542 (1994)) はDNAの理論充填限界よりはるかに低い。

従って、表面上の固定化核酸の高密度化を達成する方法が必要とされている。特に、固定化核酸の使用、取り扱い及び更なる反応を可能にする表面固定化核酸の高密度化を達成する方法が必要とされている。

例えば分析及び診断システムで使用するための核酸固定化方

法の改良の必要性に関連して、生物学的サンプルの試験及び分析を自動化し迅速に処理する精巧なラボラトリーツールの開発が要求されている。より最近では、複雑な生化学構造の分析を迅速に処理するために精巧な分析ツールを開発することが試みられている。このことは、24染色体上に少なくとも約10万個の遺伝子を含むヒトゲノムDNAの場合に特に当てはまる。各遺伝子は、生きた細胞内で特定の生化学的機能を果たす特定タンパク質をコードする。DNA配列の変化は突然変異として知られており、生化学的活性が変化するかまたは場合により該活性を無くしたタンパク質が生じ得る。また、これにより遺伝病が引き起こされ得る。3000以上の遺伝病が現在公知である。特定DNA配列があるとヒトは多数の遺伝病、例えば糖尿病、アテローム性動脈硬化症、肥満症、幾つかの自己免疫疾患及びガンに罹りやすいという証拠は多数ある。従って、DNA分析は、困難であるが多くの生命を脅かす病気の治療に根本的な情報が得られる重要な研究である。

残念ながら、DNA分析は、サイズのためまたゲノムDNAがコーディング配列及び非コーディング配列 (例えば、エクソン及びイントロン) の両方を含んでいるために特に厄介である。

そのような分析において、化学構造を分析するための従来の方法、例えば分析用サンプルを作成するためにソース材料を手動でビベッティングする方法は有用でない。必要な分析の規模を広げるために、科学者らはDNA診断用の並行処理プロトコルを開発した。

例えば、科学者らは、ピン要素のマトリックスからなるピンツールデバ

H., Smith, C. L. 及び Cantor, C. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 10162-10166 (1995))。

上記したスキームで使用されるアレーに関して、満足な性能

のために満たさなければならない基準が多数ある。例えば、固定化DNAは安定でなければならない、ハイブリダイゼーション、洗浄または分析中に脱離してはならない。固定化オリゴデオキシヌクレオチドの密度は確実な分析のために高くななければならない。DNAの表面への非特異的結合は最小でなければならない。加えて、固定化方法は、固定化プローブのハイブリダイズ能力及び酵素固相合成のためのサブストレートである能力を妨げてはならない。多くの用途に対して、DNAの1点のみ、理想的には末端が固定化されるのが最良である。

最近、上記した基準を満たすために多数の固体支持体に対するDNAの共有固定化方法が開発されている。例えば、適切に修飾したDNAを、アミノ酸 (Runnig, J. A. 及び Urdea, M. S., Biotechniques, 8, 276-277 (1990); Newton, C. R. 5, Nucl. Acids. Res., 21, 1155-1162 (1993); Nikiforov, T. T. 及び Rogers, Y. H., Anal. Biochem., 227, 201-209 (1995))、カルボキシル基 (Zhang, Y. 5, Nucl. acids. Res., 19, 3929-3933

(1991))、エポキシ基 (Lamture, J. B. 5, Nucl. Acids. Res., 22, 2121-2125 (1994); Eggers, M. D. 5, BioTechniques, 17, 516-524 (1994))、またはアミノ基 (Rasmussen, S. R. 5, Anal. Biochem., 198, 138-142 (1991)) で官能化された平坦な表面に共有結合させた。これらの方法の多くはそれぞれの用途でかなり成功を収めたが、結合したオリゴヌクレオチドの密度 (DNAは表面1mm<sup>2</sup>あたり最高約20fmol) (Lamture, J. B. 5, Nucl. Acids. Res., 22, 2121-2125 (1994); Eggers, M. D. 5, BioTech

その近位端部に有するロボットアームを用いることにより手動によるビベッティング及びスポッティングの必要性を解消したロボットデバイスを開発した。マトリックスの各ピンは、各ピンが微量滴定プレートのウェル内に浸漬され得るよう相互に離れている。ロボットアームにより複数のピンは微量滴定プレートの複数のウェルに浸漬され、それにより各ピン要素はサンプル材料で濡れる。次いで、ロボットアームによりピンツールデバイスを標的の表面の上の位置に移動し、ピンツールをピンが標的に接触する表面まで下げて表面上にスポットのマトリックスを形成する。従って、ピンツールを用いると、サンプル材料を並行に分配することによりサンプルを迅速に作成することができる。

上記したピンツール方法はサンプルアレーを迅速に作成する

ふめにうまく働くが、幾つかの欠点を有する。スポッティング操作中、ピンツールはサブストレート表面に実際接触する。小サイズのスポットを標的にプリントするために各ピンが細い先端を必要とすると仮定すると、ピンツールが標的の表面に連続的に接触するとピンツールの細い繊細な先端が磨耗し変形するのである。こうすると、精度及び生産性を減らす誤差が生ずる。

科学者らが開発した別の方法は、サンプル材料をサブストレート表面に化学的に結合する方法である。1つの特定方法では、DNAをサブストレート表面上でその場で合成して空間的に離れた多種多様の化学生成物の組を生成する。前記方法は本質的に、固相化学、光不安定性保護基及び光活性化リソグラフィーを組み合わせたフォトリソグラフィである。このシステムはサンプル材料のアレーを首尾よく作成するが、化学的に強く、時間がかかり且つ高価である。

上記したいずれの方法でもサブストレート表面上に分配されるサンプル材料の容量を十分にコントロールできないという別の問題がある。従って、上記した方法ではうまく調整され且つ正確に再現されるサンプル容量を有するサンプルアレーを作成

することができないのでエラーが生ずる恐れがある。この問題を回避する1つの試みはしばしば十分量の試薬材料を分配する作成方法である。この方法によれば

十分なサンプル容量を確保できるが、サンプル材料が無駄となり、このため高価であり利用が制限されることが多い。

サンプルを作成したとしても、科学者らは作成したサンプルを分析するための精巧な診断方法の要望に直面する。このために、科学者らはDNAのような材料を固定するために幾つかの方法を使用する。例えば、固定すべき核酸に相補的なプローブを用いるハイブリダイゼーションにより核酸配列を固定することができる。通常、核酸断片を、放射性、蛍光または化学発光であり得る感受性リポータ機能物質で標識する。これらの方法は成功するが、幾つかの欠点を有する。放射性標識は危険であり、生じた信号は経時的に減衰する。非放射性（例えば、蛍光）標識の感度は低く、高強度レーザーを固定過程で使用したときに信号が減衰する。加えて、標識化は労力及び時間がかかり、エラーが生じがちである。結果として、生化学的サンプル材料のアレーを作成し分析する方法は複雑であり、エラーを生じがちである。従って、生化学的サンプル材料のアレーを作成し、

分析する方法は複雑であり、エラーを生じやすい。

従って、本発明の目的はサンプル材料のアレーを作成するための改良システム及び方法を提供する。本発明の更なる目的は、サンプルアレーを迅速に作成し得るシステムを提供することである。本発明の更なる目的は、高密度の核酸分子が結合される支持体を提供することである。

#### 発明の要旨

本発明により提供される高密度の核酸を表面上に固定化する方法は、修飾表面もしくは修飾核酸の遊離チオール基を適切な条件で他の成分（表面もしくは核酸）のチオール反応性官能基と反応させることに基づく。この反応は直接であってもまたは二官能性架橋剤を用いて行ってもよい。好ましい実施態様では、修飾核酸がチオール基を含み、架橋剤がヨードアセチル基を含む。

核酸分子に結合した「ビーズ」が結合した固体支持体をも提供する。ビーズは必ずしも球形でなくともよく、固体支持体の表面積を高める及び／または核酸または他の分子の結合のための別の表面を提供するために固体支持体に結合させた粒子を指す。ビーズは好ましくは約 $1\mu\text{m}$ ～ $100\mu\text{m}$ の大きさを有す

面修飾剤を含む。前記キットは任意に核酸の固定化に使用するための不溶性支持体、例えば固体表面、磁性マイクロビーズまたはシリコンウェハを含む。前記キットは任意に適当な緩衝液または使用指示書をも含む。

固体支持体上に核酸分子を固定化するための上記方法を使用すると、従来の方法に比して少なくとも12.5倍高い固定化が達成される。従って、上記方法は質量分析用核酸ランニングパッドを作成するために特に有用である。

本発明の方法を用いて表面上に固定化した核酸は、（化学的及び酵素的）核酸合成、ハイブリダイゼーション及び／またはエクステンション等の各種固相核酸化学分野、並びに核酸検出及び多形性分析に基づく診断方法（例えば、米国特許第5,605,798号）で使用され得る。従って、本発明は更に、核酸分子のチオール含有誘導体をチオール反応性基含有不溶性支持体と反応させるかまたはチオール含有不溶性支持体を核酸分子のチオール反応性基含有誘導体と反応させることにより核酸分子を表面上に固定化し、次いで更に固定化核酸分子を反応させることにより核酸分子を反応させる方法を提供する。

固定化核酸を反応させる方法の特定実施態様では、固定化核酸を更に、該固定化核酸またはその一部に相補的な核酸とハイブリダイズすることにより反応させる。前記ハイブリダイゼーション反応は、サンプル中の特定核酸の存在を検出するために使用され得る。これは、病気の診断に使用され得る、サンプル

（特に生物学的サンプル）中の病原体の検出の際に特に有用である。

従って、本発明はサンプル中の標的核酸を検出する方法をも提供し、この方法では本発明の方法を用いて表面上に固定化した標的核酸に相補的なチオール含有核酸及びサンプルを、サンプル中の標的核酸が固定化核酸にハイブリダイズするような条件下で表面と接触させる。ハイブリダイズした標的核酸は、各種方法を用いて検出され得るが、好ましい方法は質量分析法である。本発明では更に、標的核酸のヌクレオチド配列の改変（例えば、欠失、挿入及び変換）を検出する方法をも提供する。上記した方法では、ハイブリダイズした標的核酸の質量分析法で測定した分子量を標的核酸配列の分子量予測値と比較する。分子量測定値の分子

る。固体支持体に結合し、更に少なくとも1つの分子、特に核酸に結合したビーズを少なくとも1個含む組成物も提供する。ビーズは当業界で公知の適当なマトリックス材料から形成され、この材料には膨潤可能なものも膨潤不能なものも含まれる。固体支持体は、化学合成及び分析において固体マトリックスとして使用される当業界で公知の任意の支持体である。例えば、核酸を本明細書に記載のように硫黄原子を介してビーズに結合させる。特定実施態様では、ビーズを表面上のウェルまたはビット内の固体支持体に結合するか、またはビーズを支持体上にアレーの形態で配列してもよい。

好ましくは、ビーズは合成及びアクセス用固体支持体として働く材料から選択される材料から調製される。前記材料の非限定例には、シリカゲル、ガラス、磁性材料、ポリスチレン/1%ジビニルベンゼン樹脂、例えばFmoc-アミノ酸-4-（ヒドロキシメチル）フェノキシメチルコポリ（スチレン-1%ジビニルベンゼン（DVB））樹脂、クロロトリチル（2-クロロトリチルクロリドコポリスチレン-DVB樹脂）樹脂、メリフィールド（クロロメチル化コポリスチレン-DVB樹脂）樹脂のようなWang樹脂、金属、プラスチック、セロルース、

例えばセファデックス（Pharmacia）の商品名で市販されているように架橋デキストラン、セファロース（Pharmacia）の商品名で市販されている水素結合した多糖類型アガロースゲルのようなアガロースゲル、並びに当業界で公知の他の樹脂及び固相支持体が含まれる。好ましい実施態様では、ビーズは直径約0.1～ $500\mu\text{m}$ 、より好ましくは約 $1\sim 100\mu\text{m}$ の大きさを有する。

固体支持体は任意の形態をとり得、非限定的にビーズ、毛細管、プレート、膜、ウェハ、コム、ピン、ビット付きウェハ、ビットまたはナノリットウェルを有するアレー、並びに当業界で公知の他の形状寸法または形態が含まれる。

また、不溶性支持体上の固定上に核酸を固定化するためのキットも提供される。1つの実施態様では、キットは適切な量のi)チオール反応性架橋剤及びii)前記チオール反応性架橋剤と反応し得る官能基を有する表面を修飾するための要

量予測値からの偏差が標的核酸のヌクレオチド配列中の改変における変化を示す。

本発明のサンプル中の標的核酸を検出する他の方法では、標的核酸をチオール反応性基を含む表面上に固定化する。この方法では、固定化前に、オリゴヌクレオチドプライマーが3'-または5'-ジスルフィド結合を含む反応で標的核酸を増幅させ、生じた産物を還元して、チオール含有核酸を生成する。チオール

含有核酸をチオール反応性基を含む表面上に固定化し、固定化核酸またはその一部に相補的な一本鎖核酸と接触させる。一本鎖核酸のハイブリダイゼーションは各種方法により検出され得る。例えば、一本鎖核酸を容易に検出し得る放射性もしくは化学発光標識で標識化することができる。好ましい実施態様では、一本鎖核酸は質量分析法により検出される。

固定化核酸を反応させる別の実施態様では、固定化核酸を更に、該固定化核酸またはその一部にハイブリダイズした核酸をエクステンション（延長）させることにより反応させる。エクステンション反応は、例えば本発明の方法を用いて不溶性支持体に固定化したDNA分子を配列決定する方法において使用され得る。従って、本発明はサブストレート上のDNA分子の配列を決定する方法をも提供し、この方法ではDNA分子のチオール含有誘導体をチオール反応性基を含む不溶性支持体の表面上に固定化し、固定化DNA分子の一部に相補的な一本鎖核酸とハイブリダイズさせ、その後1つ以上のジデオキシヌクレオチドの存在下でDNA合成を実施する。

本発明の表面上に固定化した核酸にハイブリダイズさせる核酸プライマーのエクステンションは、標的核酸のヌクレオチド配

列の改変（例えば、欠失、挿入または変換）を検出する際にも使用され得る。従って、本発明は標的核酸配列中の改変を検出する方法を提供し、この方法では本発明の固体支持体に固定化したチオール含有標的核酸に一本鎖核酸をハイブリダイズし、ハイブリダイズした一本鎖核酸を分子の3'末端にヌクレオチドを付加することにより延長する。エクステンション産物は例えば質量分析により特徴付



けられ、その特徴が固定化標的核酸に相補的な配列の予想される特徴と異なるかどうかを調べる。例えば質量分析で測定したエクステンション産物の分子量を標的核酸に相補的な核酸の分子量予測値と比較する。分子量予測値との偏差が標的核酸の配列の改変を示す。

本発明の標的核酸配列中の改変を検出する方法の特定実施態様では、チオール反応性表面に固定化する前に、標的分子をオリゴヌクレオチドプライマーが3'-または5'-ジスルフィド結合を含む反応で増幅させることができる。生じた産物を還元してチオール含有標的核酸を生成する。次いで、チオール含有標的核酸をチオール反応性基を含む表面に固定化し、一本鎖相補的核酸をハイブリダイズし、延長させる。

本発明の標的核酸配列中の改変を検出する方法の更なる実施

態様では、標的核酸に相補的な一本鎖核酸を、チオール基-チオール反応性官能基結合及び開裂可能なリンカー部分を含む結合を介して表面に固定化する。標的核酸を含むサンプルを、標的を固定化一本鎖核酸とハイブリダイズする条件下で表面と接触させる。固定化した一本鎖核酸を、分子の3'末端にヌクレオチドを付加することにより延長する。延長後、二本鎖分子を変性し、一本鎖の固定化エクステンション産物をリンカーの位置で表面から開裂する。エクステンション産物は、例えば質量分析により特徴付けられ、その特徴を固定化標的核酸に相補的な配列の予想される特徴との違いを調べる。

本発明の方法に従って固体サブストレートに固定化した核酸に基づく固相核酸化学の用途はすべて、チオール含有核酸とチオール反応性表面またはチオール反応性核酸とチオール含有支持体を用いて実施され得る。

本発明は、チオール含有核酸を、その表面上に規則的に配列してチオール反応性基を含む不溶性支持体と接触させることによりサブストレート表面上に核酸のアレーを形成する方法をも提供する。本発明のサブストレート表面上に核酸のアレーを形成する別の方法では、支持体表面上に規則的に配列してチオール

ル官能基を含む不溶性支持体をチオール反応性基を含む核酸と接触させる。

ることによりサンプル材料のアレーを形成することができる。別の実施態様では、作成し

たサンプルアレーを、質量分析のためのサンプルアレーを配置するプレートアセンブリに移す。このために、分析するサンプル材料の組成を示すと理解され得る1組のスペクトル信号を発生する質量分析計を用いる。

本発明のサブストレート表面上に化学的または生物学的方法で特定量の流体（ナノ容量及びナノ容量以下の流体）を分配するための分配装置は、複数の側面と複数の孔が形成されてなる底部部分とを有し、前記側面と底部部分により内部が規定されるハウジング、前記孔内に取り付けられた、ハウジングの内部に流体連通して配置されたナノ容量の流体を保持するためのナノ容量サイズの流体保持チャンバを有する1つ以上の流体通過ベシクル(fluid transmitting vesicles)、及び流体をベシクルの流体保持チャンバに充填したときにナノ容量サイズの流体通過ベシクルからナノ容量の流体を選択的に分配するためにハウジングの内部に連通している分配要素を含み得る。本明細書に記載するように、前記分配要素により、装置をサブストレート上に位置合わせして配置したときにサブストレート表面上にナノ容量の流体を分配することができる。

1つの実施態様では、前記流体通過ベシクルは近位開放端部

と前記孔内に取り付けられたときに前記ハウジングの底部部分を越えて延びている遠位チップ部分とを有する。このようにして、前記近位開放端部は孔内に取り付けられたときにハウジング内部と流体連通して前記流体保持チャンバを配置している。前記した複数の流体通過ベシクルは任意に、ハウジングの孔内に取外し自在且つ取替え自在に取り付けられているか、またはハウジング内に孔を固定的に取り付けるためのグルーシールを含み得る。

1つの実施態様では、前記流体保持チャンバは毛管作用により流体を満たすのに寸法的に適合した狭い径を含み、毛管作用により流体で実質的に完全に満たされる大きさを有し得る。

1つの実施態様では、前記した複数の流体通過ベシクルが流体送達ニードルの

更に本発明は、分析用サンプルを作成するシステム及び方法、特に診断分析用サンプルのアレーを作成するためにサブストレート表面上に低容量の流体材料を分配するシステム及び方法を提供する。本発明のサンプル材料のアレーを作成するシステム及び方法は、通常試薬材料を使用し保存するために余り高価でなく、高度に再現可能なサンプルアレーを迅速に作成することができる。

サブストレート表面上に低容量の流体材料を分配するためのシステム及び方法として、本発明ではサブストレート表面上にサンプル材料のマルチエレメントアレーを作成するために使用することができる連続及び並行分配ツールを提供する。サブストレート表面は平坦であっても、または受容材料のウェルを含むように幾何学的に変更されていてもよい。

1つの実施態様で、前記ツールは、サンプルアレーを並行に作成し得るものである。このために、前記ツールは、各ピンがナノリッター容量の流体を保持するのに適した狭い内部チャンバを含み得るベシクルエレメントまたはピンのアセンブリと理

解することができる。各ピンは、それ自体内部チャンバを有するハウジングの内側に適合し得る。ハウジング内部は、ピンの内部チャンバを介する流体の流れを調節するために内部ハウジングチャンバ内の圧力をコントロールする圧力源に接続することができる。こうすると、ベシクルからの特定量の流体の分配をコントロールすることができる。

別の実施態様では、前記ツールは、内部チャンバを有する毛細管ピンを含み得るジェットアセンブリと、ピンに取り付けられ、ピンから流体を放出させるためにピンの内部チャンバを介して流体を動かすことができるトランスデューサ要素とを含み得る。このようにして、前記ツールは、ピンから流体をスプレーすることによりサブストレート表面に流体スポットを分配することができる。或いは、前記トランスデューサにより流体液滴を毛細管から伸長させ、液滴がサブストレート表面に接触することにより流体をサブストレートに流すことができる。

更に、前記ツールは、サンプルアレーを形成するためにサブストレート表面の上の異なる位置にピンを移動させながら一連のステップでサンプル材料を分配す

アレーからなり、このニードルは金属、ガラス、シリカ、ポリマー材料または他の任意の適当な材料で形成され得る。

1つの実施態様では、前記ハウジングは、頂部部分及び複数の流体通過ベシクルを機械的に偏移して前記ハウジングの底部部分とシール接触させる機械的偏移手段を含み得る。1つの特定実施態様では、各流体通過ベシクルはフランジを含む近位端

部部分を有し、更にハウジング内部と外部環境との間にシールを形成するために前記フランジと前記ハウジング底部部分の内面との間に配置されるシーラー要素を含む。前記偏移手段は機械的であり、それぞれの一端が前記した各流体通過ベシクルの近位端部に、他端が前記ハウジング頂部部分の内面に連結している複数のスプリング要素を含み得る。前記スプリングはシールを形成するために前記ベシクルの近位端部に機械的偏移力を加えることができる。

別の実施態様では、前記ハウジングは更に、頂部部分及び該ハウジング頂部部分をハウジング底部部分に固定するための固定手段を含む。前記固定手段は、ハウジングの頂部部分及び底部部分の1つに形成された複数のファスナ受容孔とハウジングの頂部部分及び底部部分を一緒に固定するために前記孔内に取り付けられる複数のファスナとを含み得る。

1つの実施態様では、前記分配要素は特定圧力条件下でハウジング内部を処置する(dispose)ために前記ハウジング内部に流動的に連結した圧力源を含み得る。更に、前記流体通過ベシクルが毛管作用により満たされる実施態様では、前記分配手段が異なる圧力条件下でハウジングの内部を処置するために圧力

源を変更できる圧力コントローラを含み得る。こうして、各ベシクルの流体保持チャンバを所定流体量に相当する所定高さまで満たすために毛管作用を補償する(offset)に十分な特定圧力条件下でハウジング内部は処置される。加えて、前記コントローラは更に、特定ナノリッター容量の流体を各ベシクルのチャンバから選択的に排出させるための流体選択手段を含むことができる。1つの特定実施態様では、ハウジング内部に対して加えられる圧力に対して可変可能なコントロー

ルを与えるためにデータ処理システムで動くコンピュータプログラムの制御下で操作する圧力コントローラを含む。

1つの実施態様では、前記流体通過ベシクルはハウジングの内部に対して開放した近位端部を有し得、ベシクルの流体保持チャンバは該近位開放端部でメニスカスを形成することなく毛管作用により流体で実質的に完全に満たされる大きさを有している。前記装置は任意に、複数のベシクルを含み、その第1部分のベシクルは第1の大きさの流体保持チャンバを含み、第2部分は第2の大きさの流体保持チャンバを含み、これにより複数の流体容量が分配され得る。

別の実施態様では、前記分配装置は、特定圧力条件下でハウ

ジング内部を処置するためにハウジングに連結しておりハウジング内部と連通している圧力源を有する流体選択要素及び前記圧力源に連結した、前記した各流体通過ベシクルの流体チャンバから分配される流体の量を変化させるべく該流体通過ベシクルの流体チャンバに正圧を加えるために前記ハウジング内部の圧力を変化させる調節要素を含み得る。前記した選択要素及び調節要素は、内部チャンバに接続した圧力コントローラの操作を命令するデータ処理システムで動くコンピュータプログラムであり得る。

更に別の実施態様では、本発明の装置はマルチウェルサブストレーットの1つ以上のウェルに対して化学的または生物学的手法で流体を分配するためのものである。前記装置は、複数の側面と複数の孔が形成されてなる底部部分とを有し、前記側面と前記底部部分により内部が規定されているハウジング、前記孔内に取り付けられている、前記ハウジングの内部に連通して配置された流体保持チャンバを有する複数の流体通過ベシクル、及び前記ハウジング内部と連通している、1組の複数の流体通過ベシクルから分配されるべく前記ベシクルの流体保持チャンバに供給される流体の量を自由に選択するための流体容量選

択・分配手段を含み得る。従って、前記分配装置はサブストレーット上に位置合わせして配置されたときに前記分配手段がマルチウェルサブストレーットのウェルに特定量の流体を分配する。

(deposit)ステップを含む。更に、前記方法は、マトリックス材料の溶媒を蒸発させるために所定時間待機するステップを含む。本発明の方法は、マトリックス材料の溶媒を蒸発させた後、蒸発させたマトリックス材料にある容量の分析対象流体を放出して前記マトリックス材料で溶解し、前記サブストレーット表面上に結晶性構造物を形成させるステップを含む。このマトリックス材料を分析対象材料で再溶解させるステップは、特定の分析方法、例えば質量分析法において材料の組成を分析するのに役立つことが理解される。

また、本発明の方法は、分析対象材料とマトリックス材料からなる混合物及び他の材料組成物を分配するステップを含み得る。こうして、前記マトリックス及び分析対象材料は1つの材料としてサブストレーット表面に送達される。更なるステップにおいて、作成されたサンプル材料のアレーは前記サンプル材料の組成を示す情報を測定する診断ツールにかけられ得る。

前記診断ツールは質量分析計を含み得る。前記質量分析計は飛行時間型質量分析計、フーリエ変換質量分析計、またはサンプルアレーの組成を分析することができる他の適当な型の質量分析計であり得る。

本発明の1つの実施態様において、内部チャンバを有するベシクルを用意するステップは、流体を前記チャンバを通して移動させるために圧電要素を有するベシクルを用意するステップを含む。この方法は、前記ベシクルを前記サブストレーット表面を横断してラスタさせることによりベシクルを移動させ、サンプル材料のアレーを作成するステップを含み得る。

本発明の別の実施態様では、並行処理プロトコルを使用することができ、この場合前記処理中に使用されるベシクルはサブストレーット表面上の第1の複数位置に流体を分配するためにマトリックスに配置された複数のベシクルを有するベシクルアセンブリを含む。このようにして、前記方法によれば1回の操作でサブストレーット表面上にサンプル材料のマトリックスが形成される。オフセット印刷が、ベシクルマトリックスを用いて複数回印刷ステップを使用することによりサンプル材料の大きなマトリックスを形成するために使用され得る。本発明の範囲を逸脱しないで本発明により他の印刷技術を使用することもできる。

更に別の実施態様では、本発明はマルチウェルサブストレーットの1つ以上のウェルに対して化学的または生物学的手法で流体を分配するための流体分配装置を提供し、前記装置は、複数の側面と頂部部分と複数の孔が形成されてなる底部部分とを有し、前記側面、前記頂部部分及び前記底部部分により内部が規定されているハウジング、前記孔内に取り付けられた、前記ハウジング内部に流体連通して配置されたナノ容量の流体を保持する大きさの流体保持チャンバを有する複数の流体通過ベシクル、及び前記した複数の通過ベシクルを機械的に偏移して前記ハウジングの底部部分とシール接触させるための機械的偏移手段を含む。

本発明のサブストレーット表面上にサンプル材料のアレーを作成する一般的な方法は、流体を収容する内部チャンバを有するベシクルを用意するステップ、前記ベシクルをサブストレーット表面上の第1位置に隣接して配置するステップ、サブストレーット表面の第1位置でナノリッター容量の流体を分配するために

ベシクルをコントロールするステップ、及び前記サブストレーット表面に隣接する1組の位置に前記ベシクルを移動させて、サンプル材料のアレーを形成するために前記組の各位置に流体を分配するステップを含む。

本発明のサンプル材料のアレーを作成する一般的方法で使用されるサブストレーットは、サンプル材料を受容するための平坦表面及びベシクルのチャンバから放出され得る流体を受容するための位置を規定するために表面上に形成されたウェルを含む表面を包含し得る。前記サブストレーットは、シリコン、金属、プラスチック、膜、ポリマー材料、金属をグラフトしたポリマーであり得、また化学的に官能化させた、ビーズで官能化させたもしくは樹枝状捕捉材料で官能化させたサブストレーット、または上記の組み合わせ、または分配される流体を受容するのに適当な類似材料であり得る。

本発明のサブストレーット表面上にサンプル材料のアレーを作成する一般的方法において、前記装置は分析対象材料及び該分析対象材料の分析を助ける支持体材料、例えばマトリックス材料を分配し得ることは理解され得る。このために、本発明の方法は、サブストレーット表面上にマトリックス材料を沈着させる

別の実施態様では、サブストレーット表面に対してベシクルを接触させて該サブストレーット表面にサンプル材料をスポットす

ることにより、流体をサブストレーット表面に分配し得る。或いは、前記方法は、流体の液滴をベシクルの遠位チップ上またはチップで形成させる別の非接触印刷方法を用いる。流体液滴は、サンプル材料をサブストレーット表面に送達するために該表面と接触させる。この方法によれば、ベシクルをサブストレーット表面に接触させることなく既知容量の流体の送達がコントロールされる。

更なる実施態様では、毛管作用によりチャンバを充填するのに適した寸法を有する内部チャンバを備えたベシクルを用意する。

更に、材料を分析する方法が提供され、この方法は前記材料を含む流体を運ぶのに適したベシクルを用意するステップ、前記ベシクルをサブストレーット表面の第1位置に隣接して配置するステップ、サブストレーット表面の第1位置で特定且つ調整された容量の流体を与えるべくナノリッター容量の流体を送達するために前記ベシクルをコントロールするステップ、前記ベシクルを前記サブストレーット表面上の第1位置に隣接する第2位置に移動させて、前記サブストレーット表面上の位置のアレーに沿って特定且つ調整された容量の材料を分配するステップ、及

び前記アレーの各位置の材料について質量分析を実施するステップを含む。この方法は、マトリックス材料及び分析対象材料を混合してサブストレーット表面に送達させる流体材料を調製するステップを含み得る。或いは、この実施態様は、ベシクル内のチャンバをマトリックス材料で満たすステップ及びマトリックス材料を位置のアレーに分配するステップを含み得る。続いて、分析対象物が分配され得る。質量分析を実施するステップが、マトリックスによるレーザー脱離イオン化質量分析法、飛行時間型質量分析法、またはフーリエ変換質量分析法を実施するステップを含み得る。

また、サブストレーット表面上にサンプル材料のアレーを形成するための装置が提供される。前記装置は、流体を運ぶのに適当な遠位端部を有するベシクル、前記ベシクルに取り付けられた遠位部分を有する可動性アーム、前記ベシクルをサ

ブストレート表面上の第1位置に隣接して配置すべく前記アームを移動させるための及びサブストレート表面の第1位置でナノリッター容量の流体を与えるべく前記ベシクルをコントロールするためのコントローラ、及び前記材料の化学的組成を示す組成信号を発生させるために前記材料を分析するための診断ツールを含む。

む。この装置では、ベシクルは材料の中実軸(solid shaft)を含むことができ、ベシクルは流体を運ぶのに適した内部チャンバを有し得、ベシクルはチャンバから流体を放出するためのトランスデュサ要素内の流体を運ぶためのチャンバを含み得る。

本発明はマトリックス材料のアレーを担持した表面を有するサブストレートを提供し、このサブストレートはマトリックス材料を含む流体を移すのに適したベシクルを用意し、前記ベシクルをサブストレート表面の第1位置に隣接して配置し、サブストレート表面の第1位置にある量の流体を送達させるために前記ベシクルをコントロールし、前記サブストレート表面に隣接する組の位置に前記ベシクルを移動し、前記組の各位置で流体を送達してマトリックス材料のアレーを形成することを含むプロセスにより形成される。このサブストレート自体は、平坦なシリコンチップであっても他の適当な材料であってもよく、またはビットが形成されている、ウェルを含んでいても、粗な内表面を有するウェルを有していてもよい。

特定実施態様では、本発明のサブストレート表面上に核酸のアレーを形成する方法は、不溶性支持体の表面の所定位置を、チオール含有核酸溶液を収容した内部チャンバを有するベシクル

ルを用いて前記位置に分配される前記溶液と接触させ、これにより所定位置がチオール含有基を含む方法が提供される。或いは、サブストレートの全表面をチオール含有基で誘導化し、チオール含有核酸を表面上の所定位置にアレーが形成されるように分配する。本発明は、本発明方法により形成される核酸のアレーを担持する表面を有するサブストレートをも提供する。

本発明の上記した及び他の特徴並びに利点は以下の図面、詳細説明及び請求の

図10は、ポリメラーゼ連鎖反応(PVR)により生成させた特定のチオール含有DNA標的のシリコンウェハ表面への固定化の概略図である。DNA標的配列の一部に相補的なオリゴヌクレオチド(配列番号7)を固定化DNA標的にハイブリダイズし、MALDI-TOF MS分析を実施した。ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドに相当する主たるシグナルが質量/電荷数の測定値3618.33で認められた。なお、質量/電荷数の理論値は3622.4である。

図11は、分析用材料を受容するのに適したエッチングを施したウェルを有するサブストレートの1具体例を示す。

図12は、線形飛行時間型質量分析計から得た、図11に示すサブストレートの表面上のサンプル材料の材料組成を示すスペクトルの1例を示す。

図13は、図12に示すスペクトルを有するサンプル材料について測定した分子量を示す。

図14は、実施例2に本質的に記載のシリコンウェハの表面上の16箇所に共有結合させた、“オリゴマー1”(5'-C

TGGATGCGTCGGATCATCTTTTTT-(S)-3';配列番号8)、“オリゴマー2”(5'-(S)-CCTCTTGGAAGTGTAGTATT-3';配列番号3)及び“オリゴマー3”(配列番号1;実施例1の遊離チオール誘導体“TCUC”オリゴヌクレオチド)と称されるチオール含有オリゴヌクレオチド分子を有するシリコンウェハの表面上の4×4(16箇所)DNAアレーの概略図である。

図15は、オリゴマー1に結合させたオリゴマー1相補のオリゴヌクレオチド(5'-GATGATCCGACGCATCAGAATGT-3';配列番号9)、オリゴマー2に結合させたオリゴマー2相補のオリゴヌクレオチド(5'-AATACTACACAG-3';配列番号7)及びオリゴマー3に結合させたオリゴマー3相補のオリゴヌクレオチド(5'-CCGGGTACCGAGCTCGAATTC-3';配列番号2)を有する図14のDNAハイブリダイゼーションアレーの16箇所の各々に対する特定オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの概略図である。

範囲の記載から明らかとなるであろう。

図面の簡単な説明

図1は、分析用サンプル材料のアレーの作成システムを示す。

図2は、サブストレート表面への材料の並行分配方法を実施するために図1に示すシステムと一緒に使用するのに適したピンアセンブリを示す。

図3は、図2に示すアセンブリの底部部分を示す。

図4は、図2に示すピンアセンブリの底部部分の別の図である。

図5A-5Dは、サンプル材料のアレーの作成方法を示す。

図6A-6Bは、サブストレート表面への材料の別の分配アセンブリを示す。

図7は、本明細書に記載の二酸化ケイ素表面へのオリゴデオキシヌクレオチドの共有結合を示す概略図である。特に、二酸化ケイ素を3-アミノプロピルトリエトキシランと反応させて表面上に第1級アミノ基の均一層を形成した。次いで、ヘテロ二官能性架橋剤を第1級アミンと反応させてヨードアセタミド基を導入した。3'-または5'-ジスルフィド(5'として示す)を含有するオリゴデオキシヌクレオチドをトリス-(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)で処理してジスルフィドを遊離チオールに還元し、次いでヨードアセタミド表面にカップリングさせた。

図8は、ケイ素表面に対するオリゴデオキシヌクレオチドプローブの結合をジスルフィド還元を使用したTCEP濃度の関数としてプロットしたグラフである。

図9は、本質的に図7に示すように共有結合させた“TCUC”と称されるオリゴデオキシヌクレオチド配列(5'-GAATTCGAGCTCGGTACCCGG-3';配列番号1)及びハイブリダイズさせた“MJM6”と称されるオリゴデオキシヌクレオチド配列(5'-CCGGGTACCGAGCTCGAATTC-3';配列番号2)を有するシリコン

ウェハのマトリックスによるレーザー脱離/イオン化-飛行時間(MALDI-TOF)質量スペクトルである。

図16は、図15に概略的に示すシリコンウェハ上の4×4(16箇所)DNAアレーの代表的MALDI-TOF質量ス

ペクトルである。このスペクトルは、特定のハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドに対応する各箇所における質量/電荷数実験値の1個の主シグナルを示している。2+は、MALDI-TOF MS分析で参照標準として使用した2重荷電分子の位置を示す。\*は、洗浄作業後のチップ表面に残存している汚染オリゴヌクレオチドの残留量を示す。\*シグナルの相対位置が汚染オリゴヌクレオチドのだいたいの大きさを示す。

図17は、8×8(64箇所)DNAアレーの代表的MALDI-TOF質量スペクトルである。このスペクトルは、予測される特定のハイブリダイズされたオリゴヌクレオチドに対応する質量/電荷数実験値を有する1個の主シグナルを示している。\*は、洗浄作業後ウェハ表面に残存している汚染オリゴヌクレオチドの残留量を示す。\*シグナルの相対位置が汚染オリゴヌクレオチドのだいたいの大きさを示す。

図18は、S1AB誘導化シリコンウェハの表面に固定化されたチオール含有DNA鎖型にアニーリングしたDNAプライマーのヌクレオチドエクステンションの例示である。相補的12量体オリゴヌクレオチドプライマー(配列番号12)を、S1AB架橋剤を介してシリコン支持体に固定化した27量体チ

オール含有オリゴヌクレオチド(配列番号11)にハイブリダイズした。固定化したDNA二重らせんを含むシリコン表面をdATP、dCTP、dGTP及びddTTPの存在下エクステンション条件でDNAポリメラーゼとインキュベートし、MALDI-TOF MS分析にかけた。シリコンウェハの質量スペクトルは、主シグナルが2つ存在することを示す。1つは未延長12量体オリゴヌクレオチドに等しい質量/電荷数を有し、他の1つはウェハ上でddTTPを挿入した配列中の第1位置に対して3ヌクレオチドだけ延長させた15量体DNA分子に相当するシグナルである。

図19は、S1AB誘導化表面とプライマー-エクステンション反応で形成され

たDNA二重らせんとの距離の影響を調べるべく企画された実験の略図である。配列がそれぞれ異なる2つのチオール含有オリゴヌクレオチド（配列番号8及び11）をS1AB誘導化シリコン表面に固定化し、S1AB誘導化表面と固定化されたチオール含有DNAにハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドにより形成されたDNA二重らせんとの間に0、3、6、9及び12塩基スペーサーを有するDNA二重らせんを形成する特定のオリゴヌクレオチドとインキュベートした。

ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの遊離3'末端を、シークエナーゼDNAポリメラーゼまたはサーモシークエナーゼDNAポリメラーゼのいずれかを用い、3つのデオキシヌクレオチドトリホスフェート及び対応するジデオキシヌクレオチドトリホスフェートの存在下エクステンション条件で延長させ、生じた反応産物をMALDI-TOF MS分析にかけた。

図20は、図19に示すプライマーエクステンション実験の特定エクステンション産物の代表的MALDI-TOF質量スペクトルである。左カラムのスペクトルは、シークエナーゼを使用したエクステンション反応のMALDI-TOF MS分析から得られたものである。右カラムのスペクトルは、サーモシークエナーゼを使用したエクステンション反応の分析から得られたものである。サーモシークエナーゼDNAポリメラーゼにより、DNA二重らせんと誘導化シリコンウェハとの距離が0〜12ヌクレオチドであるハイブリダイズDNAプライマーの3'末端を延長させることができた。シークエナーゼDNAポリメラーゼにより、DNA二重らせんとシリコンウェハとの距離が3〜9ヌクレオチドであるハイブリダイズDNAを延長させることができた。

#### 詳細説明及び好ましい態様

##### 定義

特記しない限り、本明細書に記載の技術用語及び科学用語はすべて本発明が属する分野の当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。本明細書に記載の特許及び文献はすべて本明細書に援用されるものとする。

結合)を生じ得る官能基を指す。通常、チオール基は良好な求核物質であり、好ましいチオール反応性官能基は反応性親電子物質である。多種多様のチオール反応性官能基が当業界で公知であり、例えばハロアセチル（好ましくはヨードアセチル）、ジアゾケトン、エポキシケトン、 $\alpha$ 、 $\beta$ -不飽和カルボニル（例えば、 $\alpha$ 、 $\beta$ -エノン）及び他の反応性ミカエルアクセプター（マレイミドを含む）、酸ハロゲン化物、ベンジルハライド等が含まれる。特定実施態様では、ジスルフィドの遊離チオール基が遊離チオール基と（すなわち、ジスルフィド交換のようなジスルフィド結合形成により）反応し得る。本明細書中、チオール反応性架橋剤は少なくとも1つのチオール反応性官能基を含むかもしくは含むように修飾され得る架橋剤（または表面）を指す。当業界で慣用されている適当な保護基（例えば、T. W. Greene及びP. G. M. Wuts, "Protective Groups in Organic Synthesis", 第2版, John Wiley & Sons (1991))でブロックすることにより、チオール基の反応が一時的に阻止され得る。

本明細書中、選択的に開裂可能なリンカーは特定条件下で開裂されるリンカーであり、例えば光開裂性リンカー、化学的に開裂性リンカー及び酵素的に開裂性リンカー（すなわち、制限エンドヌクレアーゼサイトまたはリホヌクレオチド/RNase消化）である。リンカーを支持体と固定化DNAとの間に介在させる。

本明細書中、用語「タンパク質」、「ポリペプチド」及び「ペプチド」は翻訳された核酸（例えば、遺伝子産物）を指すときには互換可能に使用される。

本明細書中、「サンプル」は検出すべき材料を含む組成物を指す。好ましい実施態様において、サンプルは生物学的サンプル、すなわちヒト、動物、植物、細菌、真菌、原生生物、ウィルスのような生きたソースから得られる任意の材料である。生物学的サンプルの形態は任意であり、固体材料（例えば、組織、細胞ペレット及び生検によって得られた材料）及び生物学的流体（例えば、尿、血液、唾液、羊水及びうがい液（口腔細胞を含む））が含まれる。好ましくは、固体材料を流体と混合する。

本明細書中、用語「核酸」は、デオキシリボ核酸（DNA）やリボ核酸（RNA）のようなオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチド、並びにヌクレオチドアナログから調製される一本鎖もしくは二本鎖のRNAまたはDNAのアナログを指す。核酸分子は合成されたものでも、当業界で公知の方法（特に、特定の生物学的サンプルに対して適当な方法を選択する）を用いて特定の生物学的サンプルから単離されたものであってもよい。

本明細書中、ヌクレオチドはヌクレオシドモノー、ジーもしくはトリホスフェートを含む。また、ヌクレオチドはホスホロチオエートヌクレオチド及びデアザプリンヌクレオチドのような修飾ヌクレオチドも含む。鎖伸長ヌクレオチドの完全組は、4つの異なるDNA鎖型含有塩基の各々にハイブリダイズでき

る4つの異なるヌクレオチドを指す。

本明細書中、核酸合成はオリゴヌクレオチドまたはポリヌクレオチドを生成する方法を指す。前記方法として、非限定的に化学反応または酵素反応を含む方法が例示される。

本明細書中、用語「アレー」はメンバーまたは位置の規則的配列を指す。アレーは任意の数のメンバーまたは位置を含み得、アレーの形も多種多様であり得る。好ましい実施態様において、アレーは2次元であり、 $n \times m$ （ $n$ 及び $m$ は整数であり、両数でも異なってもよい）メンバーを含む。特に好ましい実施態様で、 $n$ 及び $m$ はそれぞれ4またはその倍数である。

用語「架橋剤」は当業者が認識している通りであり、本明細書では不溶性支持体に好ましくは共有結合を介して核酸を固定化させる得る試薬を指す。よって、本発明で使用するのに適切な架橋剤は不溶性支持体の表面上に存在する官能基及び核酸分子中に存在する官能基と反応し得る各種物質を含む。前記反応性を有する試薬にはホモー及びヘテロ二官能性試薬が含まれ、その多くは当業界で公知である。ヘテロ二官能性試薬が好ましい。

本明細書中、用語「チオール反応性官能基」は求核チオール

部分と迅速に反応して共有結合（例えば、ジスルフィド結合またはチオエーテル

本明細書中、「サブストレート」は本明細書に記載の方法に従ってサンプルが沈着される不溶性支持体を意味する。適当な

支持体としては、ビーズ（例えば、シリカゲル、一定の細孔を有するガラス、磁性物質、セファデックス/セファロース、セルロース）、毛細管、ガラス繊維フィルタのような平坦な支持体、ガラス表面、金属表面（スチール、金、銀、アルミニウム、銅及びシリコン）、（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリビニリデンジフロリド製の）マルチウェルプレートまたは膜を含めたプラスチック材料、ピン（例えば、組合せ合成または分析に適したピンのアレー）、または任意にプレートに有する平坦な表面（例えば、シリコンウェハのようなウェハ）のビット中のビーズが例示される。

本発明のサブストレートに対して核酸を固定化させる特定方法において、好ましいサブストレートは、好ましくは共有結合した核酸がサブストレート上に少なくとも $2.0 \text{ fmol/mm}^2$ 、より好ましくは少なくとも約 $7.5 \text{ fmol/mm}^2$ 、もっと好ましくは少なくとも約 $8.5 \text{ fmol/mm}^2$ 、更に好ましくは少なくとも約 $10.0 \text{ fmol/mm}^2$ 、最も好ましくは少なくとも約 $15.0 \text{ fmol/mm}^2$ の密度で存在するように核酸の高密度結合を支持し得るものである。本発明のサブストレートに核酸を固定化する特定方法で使用する最も好ましいサブストレート

ートの1つはシリコンであり、余り好ましくないサブストレートにはポリアクリルアミドのようなポリマー材料が含まれる。本発明のアレーを作成する方法で使用するサブストレートには広範囲の不溶性支持体材料が含まれ、非限定的にシリカゲル、一定の孔を有するガラス、セルロース、ガラス繊維フィルタ、ガラス表面、金属表面（スチール、金、銀、アルミニウム、シリコン及び銅）、（例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリビニリデンジフロリド製の）プラスチック材料及びシリコンが例示される。

核酸の固体支持体への高密度固定化

本発明の方法により、不溶性（例えば、固体）支持体に核酸分子が高密度で固

定化される。通常、核酸分子は直接または架橋剤を用いて不溶性支持体上に固定化される。

架橋剤を使用しない方法の実施態様では、修飾核酸を適当に官能化された表面と直接反応させて固定化された核酸を生じさせる。例えば、ヨードアセチル修飾表面（または他のチオール反応性表面官能基）をチオール修飾核酸と反応させて、固定化核酸を得ることができる。

本発明の方法によれば、高密度の核酸が不溶性支持体上に固

定化されるように架橋剤が選択される。理論上束縛されるつもりはないが、本発明で高密度の核酸が固定化される理由の少なくとも一因は、核酸を固定化するために従来使用されていた他の反応と比較して、架橋剤と核酸（例えば、チオール修飾核酸）との間の反応が比較的迅速に起こるからである。更に、高密度の少なくとも一因は官能化された不溶性支持体と反応性基（例えば、アミノ基または他の反応性官能基）との距離が近いことである。従って、表面を修飾するための試薬は通常、官能化された支持体と官能基との距離が近くなるように選択される。架橋剤（及び支持体表面または核酸分子を官能化させるために使用される他の試薬）は、固定化される核酸分子が支持体表面から所望の距離離れ、固定化される核酸が相互に所望の距離離れるように選択される。従って、適切な架橋剤を選択することにより核酸分子の立体障害を低下もしくは解消することができる。特定の実施態様では、架橋剤は、複数の核酸を1個の架橋部分に結合させるためのデンドリマー合成に使用される多反応性官能基を与えるように選択され得る。好ましくは、架橋剤は核酸分子と高度に反応して迅速な、完全な及び/または選択的な反応を与えるように選択される。好ましい実施態様では、試薬（例

えば、チオール基及びチオール反応性官能基）の反応容量は小さい。

核酸及びリンカー

本発明で使用される好ましい核酸はチオール修飾核酸、すなわち少なくとも1個の反応性チオール部分を含むように誘導化された核酸である。後記実施例1において更に詳細に記載するように、少なくとも1個の反応性チオールを含む核酸

ニコチンイミド（HYNIC）などの他の架橋剤も新規方法に使用され得る。架橋剤の更なる例については、例えばWong, "Chemistry of Protein Coujugation and Cross-Linking", CRC Press (1991) 及びHermanson, "Bioconjugate Techniques", Academic Press (1995) を参照されたい。

好ましい実施態様では、核酸は質量分析中に開裂される光開裂性架橋剤を用いて固定化される。光不安定な架橋剤としては、非限定的に3-アミノ（2-ニトロフェニル）プロピオン酸（Brownら, Molecular Diversity, pp. 4-12 (1995) 及びRothschildら, Nucleic Acids Res., 24: 361-66 (1996)）が例示される。

本発明の標的核酸配列中の改変を検出する方法及び固定化方法の別の実施態様では、前記した標的核酸に相補的な一本鎖核酸が、チオール基-チオール官能基結合及び開裂可能な、好ましくは選択的に開裂可能なリンカー部分を含む結合を介して表

面に固定化される。

リンカー

標的検出サイトを、標的核酸分子（T）上の適当な官能基（L'）と捕捉分子上の適当な官能基（L）との間の可逆的もしくは非可逆的結合を介して固体支持体に直接結合させることができる。可逆的結合は、質量分析の条件下（すなわち、電荷移動複合体または不安定結合のような光開裂可能な結合が比較的安定な有機ラジカル間で形成される）で開裂され得るような結合であり得る。

光開裂性リンカーは、光に露出されると開裂し（例えば、Goldmacherら, Bioconj. Chem., 3: 104-107 (1992) を参照されたい）、よって光に露出すると標的物質を放出するリンカーである。光に露出すると開裂される光開裂性リンカーは公知であり【例えば、Hazumら, Pept. Proc. Eur. Pept. Symp., 16版, Brunfeldt

は、好ましくは3'-または5'-ジスルフィドを含む核酸を還元剤で処理して製造される。前記還元剤としては、後続反応で競合しない（すなわち、ヨードアセチミド官能基と反応しない）ものが好ましい。ジスルフィド誘導化核酸は各種方法に従って合成され得る。例えば、核酸は、ジスルフィド含有修飾剤と反応させることにより3'-または5'-末端で修飾され得る。或いは、チオール化プライマーを酵素的にまたは非酵素的に核酸に結合させることができる。5'-ホスホルアミダイト官能基は、チオールもしくはジスルフィド含有シトシンまたはジオキシシトシンに対する結合点をも提供する。ジスルフィド修飾核酸の還元のために適当な還元剤の例にはトリス（2-カルボキシエチル）ホスフィン（TCEP）、ジチオトレイトールが含

まれる。TCEPは好ましくは1~100mM（最も好ましくは約10mM）の濃度、pH3~6（最も好ましくは約4.5）、温度20~45℃（最も好ましくは約37℃）で約1~約10時間（最も好ましくは約5時間）反応させる。ジチオトレイトールは好ましくは25~100mM（反応物質を単離するかどうかにより）の濃度、pH6~10（最も好ましくは約8）、温度25~45℃（最も好ましくは約37℃）で約1~約10時間（最も好ましくは約5時間）反応させる。TCEPには低pHで反応性であるという利点がある。こうした低pHによりチオールが効果的にプロトン化され、よってチオールの求核反応が抑制され、より高いpHで使用される他のジスルフィド還元剤に比較して生じる副反応が少なくなる。

後記実施例1に更に記載するように、好ましい二官能性架橋剤はN-スクシンイミジル（4-ヨードアセチル）アミノペンゾエート（SIAB）である。非限定的に例示するシマレイミド、ジチオビスニトロ安息香酸（DTNB）、N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート（SATA）、N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオール）プロピオネート（SPDP）、スクシンイミジル-4-（N-マレイミドメ

チル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）及び6-ヒドラジノ

、K.編, pp. 105-10 (1981) にはシステインに対する光開裂性保護基としてニトロベンジル基を使用することが記載されている。Yenら, Makromol. Chem., 190: 69-82 (1989)

には、ヒドロキシプロピルメタクリルアミドコポリマー、グリシンコポリマー、フルオレセインコポリマー及びメチルローダミンコポリマーを含めた水溶性の光開裂可能なコポリマーが記載されている。Goldmacherら, Bioconj. Chem., 3: 104-107 (1992) には、近UV光（350nm）に露出すると光分解を受ける架橋剤及び試薬が記載されている。更に、Senterら, Photochem. Photobiol., 42: 231-237 (1985) には、光分解可能な結合を形成するニトロベンジルオキシカルボニルクロリド架橋剤が記載されている。]、これにより光に露出すると標的物質が遊離する。好ましい実施態様では、核酸を、質量分析中に開裂される光開裂性リンカーを用いて固定化する。

更に、第4級アンモニウム基であるL'と結合を形成することができる。この場合、固体支持体の表面は、負に帯電した核酸骨格に反発し、よって質量分析に必要な脱離を促進する負電荷を有する。脱離はレーザーパルスにより生成される熱により及び/またはL'に依存して、L'発色団と共鳴するレーザーエネルギーの特異的吸収により生じ得る。

従って、L-L'結合は、（例えば、メルカプトエタノール

またはジチオエリトールにより化学的に開裂可能な）ジスルフィド結合型、ビオチン/ストレプトアビジン系、穏和な酸性条件下及び質量分析条件下で開裂され得るトリチルエーテル基のヘテロ二官能性誘導体（例えば、Kosterら, "A Versatile Acid-Labile Linker for Modification of Synthetic Biomolecules", Tetrahedron Letters, 31: 7095 (1980) 参照）、ほぼ中性条件下でヒドラジニウム/アセテート緩衝液により開裂可能なレブニル基、トリプシンのようなエンドペプチダーゼ酵素により開裂可能なア

ルキニン-アルキニンまたはリシン-リシン結合、またはピロホスファターゼにより開裂可能なピロホスフェート結合、または例えばリボヌクレアーゼまたはアルカリにより開裂されるオリゴデオキシヌクレオチド間のリボヌクレオチド結合であり得る。

官能基L'はまた、電荷移動結合体を形成して一時的なL-L'結合を形成することができる。多くの場合電荷移動結合はUV/ビ分光分析により測定され得るので(例えば、R. Foster著、Organic Charge Transfer

nsfer Complexes, Academic Press (1969) 参照)、レーザーエネルギーを電荷移動波長の対応エネルギーに変えることができ、よって固体支持体の特異的脱離を開始させることができる。当業者が認識しているように、上記目的にいくつかの組み合わせが使用され得、ドナー官能基は固体支持体上に存在させてもまた検出すべき核酸分子に結合させてもよい。また、その逆でもよい。

更に別のアプローチでは、可逆性L-L'結合を比較的安定なラジカルを均一に形成することにより生じさせることができる。レーザーパルスの影響下で、(上記した)脱離及びイオン化がラジカル位置で起こる。当業者が認識しているように、他の有機ラジカルが選択され得、前記ラジカル間の結合を均一に開裂するために必要な解離エネルギーに関連して、対応するレーザー波長を選択し得る(例えば、C. Wentrup, John Wiley & SonsのReactive Molecules, 1984参照)。

MALDI-TOF MSを用いてエキソヌクレアーゼ配列決定を行う場合、固体支持体に5'-末端を介して固定化した一本鎖DNA分子を3'-進行性のエキソヌクレアーゼを用いて片

側だけ分解し、分解したヌクレオチドの分子量をその後測定する。逆サンガー配列決定により、固定化したDNAのヌクレオチド配列が明らかになる。選択的に開裂可能なリンカーを添加することにより、測定すべき遊離ヌクレオチドの質量

る。ヒトから核酸を入手し、可変領域(遺伝素質または病気を引き起こす欠失、挿入、ミスセンス突然変異、またはウィルス性/細菌性もしくは真菌性DNAの存在)のDNA配列が検出されるばかりでなく、突然変異の実際の配列及び位置も調べる事ができる。

別の場合には、標的DNSを固定化し、プライマーをアニーリングしなければならない。このためには、公知の配列に基づいてより大きなDNAを増幅し、固定化されたフラグメント(すなわち、延長されたフラグメントは上記したようにハイブリダイズされているが支持体に固定化されていない)を配列決定する必要がある。これらの場合リンカーを挿入することは望ましくない。なぜならば、MALDI-TOFスペクトルはハイブリダイズされたDNAのものであるからである。固定化された鎖型を開裂しなくてよい。

本発明では、当業者に公知の固体支持体に核酸を固定化するためのリンカーを使用して、核酸を固体支持体に結合することができる。本発明において好ましいリンカーは選択的に開裂し得るリンカーであり、特に例示されているものである。他のリンカーには、ビスマレイミドエトキシプロパンのような酸開裂

性リンカーまたは酸不安定トリチルリンカーである。

特に標的された物質を開裂して反応により容易にアクセスできるようにしなければならない場合には、酸開裂性リンカー、光開裂性リンカー及び熱感熱性リンカーも使用することができる。酸開裂性リンカーには、非限定的にビスマレイミドエトキシプロパン、アジピン酸ジヒドラジドリンカー(例えば、Fattomら、Infection & Immun., 60:584-589 (1992) 参照)、及び細胞内トランスフェリンサイクリング経路に進入し得るに十分量のトランスフェリンを含む酸不安定トランスフェリン結合体(例えば、Weltonら、J. Biol. Chem., 266:4309-4314 (1991) 参照)が含まれる。

光開裂性リンカー

光開裂性リンカーを提供する。特に、光開裂性リンカーをオリゴヌクレオチドの固相合成で使用するのためにそのホスホルアミダイト誘導体として提供する。前

並びに洗浄によりヌクレオチドを除去することにより残りのフラグメントの質量が、固体支持体からDNAを開裂して、MALDI-TOFにより検出され得る。選択的に開裂可能なリンカー、例えば本発明で提供される光開裂可能なリンカーまたは化学的に開裂可能なリンカーを使用することにより、MALDI-TOFのイオン化及び揮発段階で生ずる前に前記開裂が選択される。同じ反応原理が、二重らせんのままで分解される二本鎖DNAの5'固定化鎖に対して適用される。同様に、前記反応原理が5'進行性エキソヌクレアーゼを用いる場合にも適用される。DNAは3'-末端を介して固体支持体に固定化される。

上記したように、本発明では少なくとも3種の固定化方法が考えられる。1) 標的核酸を増幅または入手する(プライマーを増幅または分離するために標的配列または周囲のDNA配列は公知でなければならない)。2) プライマー核酸を固体支持体に固定化し、標的核酸をハイブリダイズする(これはサンパ

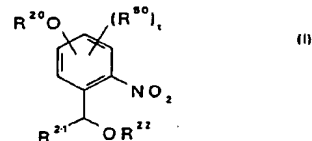
ル中の標的配列の存在を検出するかまたは該配列を決定するためである)。または、3) (増幅または分離された)二本鎖DNAを1つの所定鎖への結合を介して固定化し、二重らせんをはずすためにDNAを変性した後、標的サイトから上流が同一の高濃度の相補性プライマーを有するDNAを添加し、鎖置換を起こし、プライマーを固定化鎖にハイブリダイズする。

プライマー核酸を固体支持体上に固定化し、そこに標的核酸をハイブリダイズする実施態様では、開裂性リンカーを加えることにより遊離3'-OHが核酸合成(エクステンション)に利用されるようにプライマーDNAは5'末端で固定化され、ハイブリダイズされた標的DNAの配列が決定され得る。なぜならば、ハイブリダイズされた鎖型は変性により除去され得、延長されたDNA産物はMALDI-TOF MS用固体支持体から開裂されるからである。3)についても同様に、固定化されたDNA鎖は鎖型にハイブリダイズし、支持体から開裂したときに伸長され得る。よって、サンガー配列決定、下記するプライマーオリゴ塩基エクステンション(PROBE)、エクステンション反応は、標的配列の非可変領域に相補的な公知の上流DNA配列を有する固定化プライマーを用いて実施され得

記リンカーは、UV照射されると結合体が数分以内に完全に光開裂され得るo-ニトロベンジル部分とホスフェート結合を含んでいる。使用されるUV波長は照射がオリゴヌクレオチドにダメージを与えないように

選択され、好ましくは約350~380nm、より好ましくは365nmである。本発明で提供される光開裂性リンカーは、慣用されているホスホルアミダイトモノマー(例えば、Sinhaら、Tetrahedron Lett., 24:5846-5846 (1983); Sinhaら、Nucleic Acid Res., 12:4539-4557 (1984); Beaucageら、Tetrahedron, 49:6123-6194 (1993); 及びMatteucciら、J. Am. Chem. Soc., 103:3185-3191 (1981) 参照)に比較して匹敵し得るカップリング効率を有する。

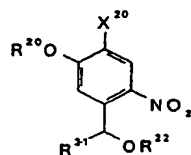
1つの実施態様では、光開裂性リンカーは下記式I:



(式中、R20はω-(4, 4'-シメトキシトリチルオキシ)アルキルまたはω-ヒドロキシアルキルであり、R21は水素、アルキル、アリール、アルコキシカルボニル、アリールオキシ

カルボニル及びカルボキシから選択され、R22は水素または(ジアルキルアミノ)(ω-シアノアルコキシ)P-であり、tは0~3であり、R20はアルキル、アルコキシ、アリールまたはアリールオキシである)を有する。

好ましい実施態様では、光開裂性リンカーは下記式II:



(II)

(式中、 $R^{20}$ は $\omega$ -(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキル、 $\omega$ -ヒドロキシアルキルまたはアルキルであり、 $R^{21}$ は水素、アルキル、アリール、アルコシカルボニル、アリールオシカルボニル及びカルボキシから選択され、 $R^{22}$ は水素または(ジアルキルアミノ)( $\omega$ -シアノアルコキシ)P-であり、 $X^{20}$ は水素、アルキルまたはOR $^{20}$ である)を有する。

特に好ましい実施態様では、 $R^{20}$ は3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピル、3-ヒドロキシプロピルまたは

はメチルであり、 $R^{21}$ は水素、メチル及びカルボキシから選択され、 $R^{22}$ は水素または(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)P-であり、 $X^{20}$ は水素、メチルまたはOR $^{20}$ である。より好ましい実施態様では、 $R^{20}$ は3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピルであり、 $R^{21}$ はメチルであり、 $R^{22}$ は(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)P-であり、 $X^{20}$ は水素である。別のより好ましい実施態様では、 $R^{20}$ はメチルであり、 $R^{21}$ はメチルであり、 $R^{22}$ は(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)P-であり、 $X^{20}$ は3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロポキシである。

別の実施態様では、光開裂性リンカーは下記式III:

より好ましい実施態様では、 $R^{23}$ は(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)P-であり、 $r$ 及び $s$ は0であり、 $R^{24}$ は3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロポキシ、4-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)ブチル、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロピル、2-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)エチル、1-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-2-プロピル、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-2-メチル-1-プロピル及び4, 4'-ジメトキシトリチルオキシメチルから選択される。最も好ましくは、 $R^{24}$ は3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロポキシである。

#### 光開裂性リンカーの製造

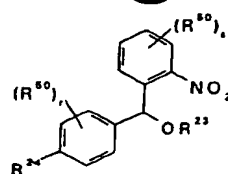
##### A. 式IまたはIIの光開裂性リンカーの製造

式IまたはIIの光開裂性リンカーは、下記する方法により、適切な出発物質を選択することにより方法を若干改変することにより、または当業界で公知の他の方法により製造され得る。

$X^{20}$ が水素である式IIの光開裂性リンカーは次の方法で製

造され得る。5-ヒドロキシ-2-ニトロベンズアルデヒドを $\omega$ -ヒドロキシアルキルハライド、例えば3-ヒドロキシプロピルハライドを用いてアルキル化し、生じたアルコールを例えばシリルエーテルとして保護すると、5-( $\omega$ -シリルオキシアルコキシ)-2-ニトロベンズアルデヒドが生ずる。このアルデヒドに有機金属を添加すると、ベンジルアルコールが得られる。使用し得る有機金属には、( $R^{21}$ がアルキルのリンカーに対しては)トリメチルアルミニウムのようなトリアルキルアルミニウム、( $R^{21}$ が水素のリンカーに対しては)ホウ水素化ナトリウムのようなホウ水素化合物、また( $R^{21}$ がカルボキシまたはアルコシカルボニルのリンカーに対しては)シアン化カリウムのような金属シアン化合物が含まれる。金属シアン化合物の場合、反応生成物であるシアノヒドリンを次いで、水またはアルコールのいずれかの存在下酸性もしくは塩基性条件下で加水分解することにより所望の化合物が得られる。

次いで、生じたベンジルアルコールの側鎖シリル基を例えばテトラブチルアン



(III)

(式中、 $R^{23}$ は水素または(シアリルアミノ)( $\omega$ -シアノアルコキシ)P-であり、 $R^{24}$ は $\omega$ -ヒドロキシアルコキシ、 $\omega$ -(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルコキシ、 $\omega$

-ヒドロキシアルキル及び $\omega$ -(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキルから選択され、未置換でもアルキルもしくはアルコキシ鎖が1つ以上のアルキル基で置換されていてもよく、 $r$ 及び $s$ はそれぞれ0~4であり、 $R^{50}$ はアルキル、アルコキシ、アリールまたはアルコキシである)

を有する。ある実施態様では、 $R^{24}$ はアルキル鎖がメチル基で置換された、 $\omega$ -ヒドロキシアルキルまたは $\omega$ -(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)アルキルである。

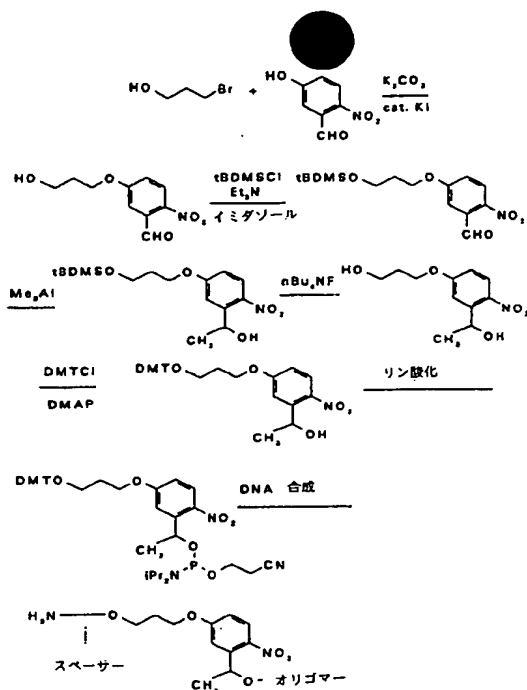
好ましい実施態様において、 $R^{23}$ は水素または(ジイソプロピルアミノ)(2-シアノエトキシ)P-であり、 $R^{24}$ は3-ヒドロキシプロポキシ、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)プロポキシ、4-ヒドロキシブチル、3-ヒドロキシ-1-プロピル、1-ヒドロキシ-2-プロピル、3-ヒドロキシ-2-メチル-1-プロピル、2-ヒドロキシエチル、ヒドロキシメチル、4-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)ブチル、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-1-プロピル、2-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)エチル、1-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-2-プロピル、3-(4, 4'-ジメトキシトリチルオキシ)-2-メ

チル-1-プロピル及び4, 4'-ジメトキシトリチルオキシメチルから選択される。

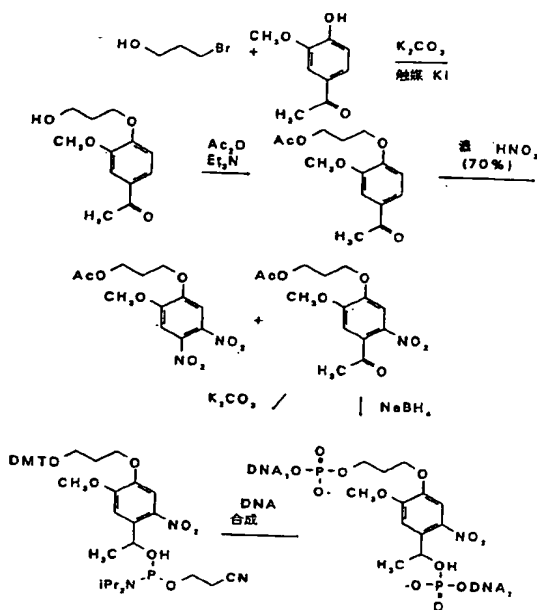
モニウムフロリドを用いて脱シリル化することにより4, 4'-ジメトキシトリチル基と交換すると、対応するアルコールが生じ、これを4, 4'-ジメトキシトリチル

クロリドと反応させる。例えば2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホリドと反応させると、 $R^{22}$ が(ジアルキルアミノ)( $\omega$ -シアノアルコキシ)P-であるリンカーが得られる。

式IIの光開裂性リンカーの合成の特定例を以下のスキームに示す。以下のスキームにはオリゴヌクレオチド合成におけるリンカーの使用も示す。このスキームは例示にすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。ここに示した合成変換の実験の詳細は実施例に記載されている。



X<sup>20</sup>がR<sup>20</sup>の式IIの光開裂性リンカーの合成では、3, 4-ジヒドロキシアセトフェノンの4-ヒドロキシを、例えば炭酸カリウムとシリルクロリドと反応させることにより選択的に保護する。前記アセトフェノンに代えてベンゾエートエステル、プロピオフェノン、ブチロフェノン等を使用することができる。次いで、生じた4-シリルオキシ-3-ヒドロキシアセトフェノンの3-ヒドロキシを(R<sup>20</sup>がアルキルのリンカーの場合には)アルキルハライドを用いてアルキル化し、例えばテトラブチルアンモニウムフロリドを用いて脱シリル化することにより、3-アルコキシ-4-ヒドロキシアセトフェノンが生ずる。次いで、この

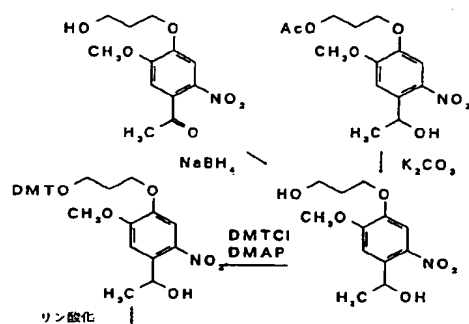


化合物の4-ヒドロキシを $\omega$ -ヒドロキシアルキルハライド、例えば3-ヒドロキシプロピルブロミドと反応させることによりアルキル化すると、4-( $\omega$ -ヒドロキシアルコキシ)-3-アルコシアセトフェノンが生ずる。次いで、この側鎖アルコールをエステル、例えばアセテートとして保護する。次いで、この化合物の5位を例えば濃硝酸を用いてニトロ化すると、対応する2-ニトロアセトフェノンが生ずる。この側鎖エステルの例えば炭酸カリウムを用いるけん化及びケトンの例えばホウ水素化ナトリウムを用いる還元を任意の順序で

実施すると、2-ニトロ-4-( $\omega$ -ヒドロキシアルコキシ)-5-アルコキシベンジルアルコールが生ずる。

上記側鎖アルコールを4, 4'-ジメトキシトリチルクロリドと反応させることにより、対応する4, 4'-ジメトキシトリチルエーテルとして選択的に保護する。更に、例えば2-シアノエチルジイソプロピルクロロホスホルアミダイトと反応させると、R<sup>22</sup>が(ジアルキルアミノ)( $\omega$ -シアノアルコキシ)Pであるリンカーが得られる。

式IIの光開裂性リンカーの合成の特定例を以下のスキームに示す。このスキームは例示にすぎず、本発明の範囲を限定するものではない。ここに示した変換の実験の詳細は実施例に記載されている。



#### B. 式IIIの光開裂性リンカーの製造

式IIIの光開裂性リンカーは、下記する方法により、適当な出発物質を選択することにより方法を若干改変することにより、または当業者に公知の他の方法により製造することができる。

通常、式IIIの光開裂性リンカーは、 $\omega$ -ヒドロキシアルキルまたはアルコキシアリール化合物、特に $\omega$ -ヒドロキシアルキルまたはアルコキシベンゼンから製造される。前記した化合物は市販されているかまたは、多くは $\omega$ -ヒドロキシアルキルハライド(例えば、3-ヒドロキシプロピルブロミド)と( $\omega$ -ヒドロキシアルキルベンゼンの場合には)フェニルリチウム

または( $\omega$ -ヒドロキシアルコキシベンゼンの場合には)フェノールとから製造される。 $\omega$ -ヒドロキシ基の(例えば、酢酸エステルとして)アシル化後、芳香族環を2-ニトロベンゾイルクロリドを用いてフリーデルクラフツァシル化すると、4-( $\omega$ -アセトキシアルキルまたはアルコキシ)-2-ニトロベンゾフェノンが得られる。ケトンの例えばホウ水素化ナトリウムによる還元及び側鎖エステルのケン化を任意の順序で実施すると、2-ニトロフェニル-4-(ヒドロキシアルキルまたはアルコキシ)フェニルメタノールが得られる。末端ヒドロキシ基を4, 4'-ジメトキシトリチルクロリドと反応させると、末端ヒドロキ



シ基は対応する4, 4'-ジメトキシトリチルエーテルとして保護される。次いで、ベンジルヒドロキシ基を例えば2-シアノエチルジソプロピルクロホスホルアミダイトと反応させると、R<sup>23</sup>が(ジアルキルアミノ)( $\omega$ -シアノアルキル)Pである式IIのリンカーが得られる。他の式IIを有する光開裂性リンカーは、上記合成における $\omega$ -ヒドロキシアルキルもしくはアルコキシベンゼンの代わりに2-フェニル-1-プロパノールまたは2-フェニルメチル-1-プロパノールを使用することにより製造され得る。上記した化

合物は市販されており、多くは例えばフェニルマグネシウムブロミドまたはベンジルマグネシウムブロミドと必要なオキシラン(すなわち、プロピレンオキシド)を触媒作用の銅イオンの存在下で反応させることによって製造され得る。

化学的に開裂可能なリンカー

各種の化学的に開裂可能なリンカーを使用して、固定化核酸と固体支持体との間に開裂可能な結合を導入することができる。

現在、酸不安定リンカーが質量分析用、特にMALDI-TOF MS用の化学的に開裂可能なリンカーとして好ましい。なぜならば、酸不安定結合が3-HPAマトリックス溶液を添加すると核酸のコンディショニング中に開裂するからである。酸不安定結合を別のリンカー基、例えば酸不安定トリチル基として導入することができ、またはジソプロピルシリルを用いて1つもしくはそれ以上のシリルインターヌクレオシド架橋を導入し、ジソプロピル結合オリゴヌクレオチドアナログを形成することにより合成核酸リンカー中に組み入れることもできる。DNA骨格中のホスホジエステル結合をジソプロピルシリル架橋で置換し、穏和な酸性条件下で、例えば1.5%トリフルオロ酢酸(TFA)または3-HPA/1%TFA MALDI

TOFマトリックス溶液の条件下でDNA分子中に1つもしくはそれ以上の鎖内切断が導入される。ジソプロピルシリル結合オリゴヌクレオチド前駆体及びアナログを製造する方法は当業者に公知である(例えば、Sahara, T. Org. Chem., 58:7827-7831 (1993)を参照されたい)。

コム、ピン(例えば、組合せ合成または分析に適したピンのアレー)、または任意にフィルタープレートに有する平坦な表面、例えばシリコンウェハのようなウェハのピット中のビーズが例示される。

#### 質量分析

核酸は固定されると、任意の手段、例えば、UV/VIS、IR、蛍光、化学発光を用いて、またはNMR分光分析、質量分析、または当業界で公知の他の方法を用いて、またはこれらを組み合わせて分析され得る。好ましい質量分析計フォーマットにはイオン化(1)、例えばマトリックスによるレーザー脱離(MALDI)、連続もしくはバルスエレクトロスプレー(ESI)及び関連方法(例えば、イオンスプレーまたはサーモスプレー)、または焼状クラスター衝撃(MCI)が挙げられる。これらのイオン源は、線形もしくは非線形フレクトロン飛行時間(TOF)、4倍もしくはその倍数、1個もしくはそれ以上の磁気セクター、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(FTICR)、イオントラップ、及びハイブリッド検出基を与えるこれらの組み合わせ(例えば、イオントラップ/飛

行時間)を含めた検出フォーマットと一致させることができる。イオン化のために、複数のマトリックス/波長の組み合わせ(MALDI)または溶媒の組み合わせ(ESI)を使用することができる。

#### DNAアレーの作成

本発明は、診断ツールによる分析用サンプル材料のアレーを作成する方法及びシステムを提供する。例えば、診断ツールによる分析用サンプル材料のアレーを作成する1つのシステムが図1に示されている。図1に示すシステム10は、データ処理装置12、モーションコントローラ14、ロボットアームアセンブリ16、モニター要素18a、中央処理装置18b、ソース材料の微量滴定プレート20、ステージハウジング22、ロボットアーム24、ステージ26、圧力コントローラ28、管路30、マウンティングアセンブリ32、ピンアセンブリ38及びサブストレータ要素34を含む。図1に示す概略図においては、ロボットアームアセンブリ16が可動マウント要素40及び水平スライド溝42を含み得る

前記オリゴヌクレオチドアナログは、ジソプロピルシリル誘導化デオキシリボヌクレオシドを用いる固相オリゴヌクレオチド合成により容易に製造され得る。

#### 核酸のマス修飾

特定の実施態様では、3'-または5'-末端以外の位置を修飾した核酸を使用することができる。3'-または5'-末端以外の位置でヌクレオチドの糖部分を修飾することは慣用の方法を用いて可能である。また、核酸塩基の修飾は、例えばF. Eckstein編、Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, IRL Press (1991)に記載されているように、例えばdTのC-5をリンカーアームで修飾することにより実施し得る。前記したリンカーアームはチオール部分を含むように修飾され得る。或いは、骨格修飾核酸(例え

ば、ホスホルアミダイトDNA)を用いて、チオール基を修飾ホスフェート骨格により付与される置換中心に結合させることができる。

好ましい実施態様では、例えば上記したように核酸を修飾させても、核酸または核酸配列のその相補体にハイブリダイズする能力は実質的に損なわれない。従って、好ましい修飾は、ワトソン-クリック塩基対に関与する核酸の官能性を実質的に変化するのを避けるべきである。核酸は非末端チオール基が存在するように修飾され得、核酸は支持体に固定化したときに自己相補の塩基対を形成して二重らせん領域を有するヘアピン構造を形成できる。

#### 固体支持体及びサブストレータ

本発明で使用する不溶性支持体及びサブストレータとして、非限定的にヒーズ(シリカゲル、一定の孔を有するガラス(controlled pore glass)、磁気ビーズ、セファデックス/セファロースビーズ、セロルースビーズ等)、毛细管、平坦な支持体、例えばガラス繊維フィルター、ガラス表面、金属表面(スチール、金、銀、アルミニウム、シリコン及び銅)、(例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリアミド、ポリビニリデン

ジフルオリド製の) マルチウェルまたは膜を含めたプラスチック材料、ウェハ、

ことが示されている。ロボットアームは場合によりピン36の周りを回転することができ、これによりアーム24の移動範囲が広がり、アーム24はピン

アセンブリ38をソースプレート上に配置することができる。

図1に示すデータ処理装置12は、データを処理し且つロボットアセンブリ16の動作及び操作を制御するための情報を与えるプログラム指示を実行するのに適したIBM PC互換性コンピュータシステムのような慣用のデジタルデータ処理システムでよい。当業者には自明のように、データ処理装置12は、ロボットハウジング16に統合されているロボットアセンブリを操作する指示信号のプログラムを処理するのに適していれば任意のものであり得る。場合により、データ処理装置12は、ロボットハウジング16に統合されているマイクロコントローラ式アセンブリであり得る。別の代替実施態様例では、システム10はプログラム制御されなくてもよく、ロボットアセンブリ16を操作するための指示を保存するファームウェアメモリを有するシングルボードコンピュータであってもよい。

図1に示す実施態様では、コントローラ14がデータ処理装置12とロボットアセンブリ16とを電子的に接続している。図示のコントローラ14は、ロボットアーム24を特定位置に配置するためにロボットアセンブリ16のモータ要素を駆動させるモーションコントローラである。また、コントローラ14

は、図示のピンアセンブリ38の各ピン要素から放出される流体容量を調整すべく圧力コントローラ28に対して命令するためにロボットアセンブリ16に指示を与えることができる。図示のモーションコントローラ14のデザイン及び構造は電気工学の分野で周知の原理に従い、本発明の範囲を逸脱しないでロボットアセンブリ16を駆動させるのに適した任意のコントローラ要素を使用することができる。

図1に示すロボットアセンブリ16は、コントローラ14に電子的に接続している。図示のロボットアセンブリ16は、ロボットアームをXY面の周りに移動させるためのXYテーブルを含み、更にロボットアームをXY面に対して直交方

向に移動させるためのZ軸アクチュエータを含むガントリーシステムである。図1に示すロボットアセンブリ16は、XYステージに取り付けられるアーム24を含み、このアームはXYアクセスにより規定される面内を移動する。図示の具体例では、XYテーブルは、XY面に対して直交方向のZ軸に沿ってテーブル全体を移動させるためにZ軸アクチュエータに取り付けられている。こうして、ロボットアセンブリは、サブストレータ34及びソースプレート20の上の任意の位置にピンアセンブリ3

8を配置することができる3自由度を有する。なお、図1においてサブストレータ34及びソースプレート20はロボットアセンブリ16に取り付けられたステージ26土に置かれている。

図示のロボットアセンブリ16は電気工学の分野で周知の原理に従い、図示のサブストレータ34のようなサブストレータ及びソースプレートに隣接した位置にピンアセンブリを移動させるのに適したロボットアセンブリの1例にすぎない。従って、当業者には自明のように、本発明の範囲を逸脱しないで本明細書の記載に従って別のロボットシステムを使用することができる。

図1に具体的に示すロボットアセンブリ16は、ピンアセンブリ38に接続したマウント32に管路30を介して連結している圧力コントローラ28を含む。この具体例では、マウント32は、管路30をピンアセンブリ38に流体的に接続させるために内部チャネルを含んでいる。従って、圧力コントローラ28は、管路30及びマウント32を介してピンアセンブリ38に流動的に連結している。こうして、コントローラ14は、ピンアセンブリ38に対して加えられる流体圧力を選択的にコントロールするために圧力コントローラ28に対して信号を送

ることができる。

図2は、圧力コントローラ28を含む図1に示すシステムを用いて実施するのに適したピンアセンブリ50の1具体例を示す。図示した具体例では、ピンアセンブリ50は上部ブロック52と下部ブロック54から形成されるハウジングを含み、前記した上部ブロック52と下部ブロック54とはスクリュウ56a及び

たはスエージロック80は内部チャンバのガス抜きのために設けられる管路86に連結され得る。中央径88は、スエージロック80を通り抜けて延びており且つチューブ要素に連結しており、チューブ要素は更にバルブ82に接続しており、これにより内部チャンバ58は圧力源またはガス抜き出口に流動的にまた選択的に連結される。

上記した図2に示すピンアセンブリ50はサブストレータ要素90上に配置されており、このサブストレータ要素90はサブストレータ90の上表面をエッチングして形成される複数のウェル92を含む。図2に示すように、ベシクル62a-62dのピッチは、各ベシクルと隣接のベシクルとがサブストレータ90の上表面をエッチングして形成されるウェル92間のピッチ距離の倍数である距離だけ離れているようなピッチである。以下の記載から明らかなように、このスペースにより流体を並行して分配するのが容易となり、1回の操作で流体を複数のウェルに分配することができるようになる。各ベシクルは、ステンレススチール、シリカ、ポリマー材料または流体サンプルを保持するのに適した他の材料から構成され得る。1つの例では、

ニッケルプレートに金メッキした硬化ベリリウム銅からなる16個のベシクルがアセンブリに使用されている。このベシクルの長さは43.2mmであり、ベシクルの軸の外径0.46mmに目盛がつけられおり、軸の左端は凹状である。ポインティング精度が約501 $\mu$ mであるようにピンを選択した。しかしながら、適当な形状、例えばこれに限定されないが平坦な形、星形、凹形、山形中空形、山形半中空形、片側もしくは両側傾斜形(angled on one or both sides)またはその他の幾何学的形状のピンがデバイスに使用され得ることは自明である。

図3は、図2に示したピンアセンブリ50の下部ブロック54を側面から透視した図である。図3は1つのピンアセンブリをほぼ同寸で示す。図示するように、下部ブロック54は底部プレート98と周囲ショルダー100を有する。底部プレート98の厚さは約3mmであり、ショルダー100の厚さは約5mmである。

図4は、図2に示すピンアセンブリ50と一緒に使用するのに適した1つの下

56bにより連結され、こうして内部チャンバ58が規定される。図2には更に、内部チャンバ58を流動的にシールするためにハウジングがシール要素を含み得ることが示されており、図2において該シール部材は上部ブロック52と下部ブロック54との間に位置し且つ内部チャンバ58の周囲を完全に包囲するオリングガスケット60として示されている。図2には更に、ピンアセンブリ50が複数のベシクル62a-62dを含み、各ベシクルはその中を通り抜けて伸長している軸方向径を含んでおり、こうして図示の保持チャンバ64a-64dが形成されていることが示されている。図示のベシクルの各々は、ハウジングの下部ブロック54内に設けられているそれぞれの孔68a-68dを介して延びている。

図示の具体例に更に示すように、ベシクル62a-62dの

各々はシール要素70a-70dにもたれるように置かれた上部フランジ部分を有しており、こうしてベシクルと下部ブロック54との間に流密性シールが形成され、孔68a-68dを通過して流体が流れるのが防止される。流密性を保つために、図示のピンアセンブリ50は更に1組の偏移要素74a-74dを含み、図2において該偏移要素はスプリングとして示されており、このスプリングは図示の具体例においてベシクル62a-62dのフランジ要素をそれぞれのシール要素70a-70dに対して押しつけるために圧縮状態にある。図2に示すように、偏移要素74a-74dはベシクルと上部ブロック52との間に延びている。スプリング74a-74dの各々はマウンティングパッド76a-76dに固定的に取り付けられており、このパッドでスプリング要素は上部ブロック52に接続され得る。上部ブロック52は更に孔部78をも含み、図2において該孔部78は中央に配置されており、孔部78内に回転自在に設置され得るスエージロック(swagelok)80を受容するためのねじ付き径を含む孔として示されている。

図2に更に示されているように、スエージロック80は管路によりバルブ82に取り付けられており、このバルブ82を介

してスエージロック80は圧力源に連結され得る管路84に接続され得るか、ま

部ブロック54の一般的な構造及び大きさを上から透視した図である。図4に示すように、それぞれがベシクルを受容するのに適した16個の孔を設けるために下部ブ

ック54は孔68の4 $\times$ 4マトリックスを含んでいる。図2を参照して上記したように、孔68間のスペースは通常、サブストレータ表面上のウェル間及びソースプレートのウェル間の距離の倍数である。従って、図4に示す下部ブロック54を有するピンアセンブリは流体を最高16個のウェルに同時に分配することができる。図4には、ブロック54の各辺の長さが通常22mmであり、孔68の間のピッチが約4.5mmであるような1つの下部ブロック54の一般的な大きさが示されている。前記したピッチは、図2にサブストレータ90で示すように流体を約500 $\mu$ m離れた位置に分配するサブストレータと一緒に使用するのに適している。図4には、下部ブロック54が、図2に示すシール要素60のようなオリングシール要素を受容するためのオリング溝94を任意に含み得ることをも示している。このO溝部材94によりシール要素60により形成される流体シールが強化・改良され得ることが理解される。

ステンレスは約 $\pm 25\mu$ mまで正確に突き通すことができるので、ピンブロックはステンレススチールから製造され得るが、G10ラミネート、PMMAまたは他の適当な材料のような各種プローブ材料も使用することができる。ピンブロックは任意

の数の孔を含み得、16個のピンを適所に保持する16個の容器と示されている。各ピンのポインティング精度を高めるために、アライメントプレースを、ピンの先端の約6mmが微量測定プレートのウェルに浸漬し得るようにブロックの下に任意に配置することができる。図示のツール中のプローブの配置は、384ウェルの微量測定プレートを適当に配置するように設計されており、この場合プローブの中心間スペースは4.5mmとなる。4 $\times$ 4プローブのアレーを選択した。なぜならば、このアレーは本出願人が使用したMALDI TOF MSのxyステージの移動距離である1インチ平方未満に適合するからである。デバイス

の頂部にステンレススチール製カバーを設けることによりピンアセンブリは完成し、これはロボットのZアームに取り付けられる。

図5に示すロボットアセンブリ16は、図2に示すピンアセンブリ50と類似の配置を有するピンツールアセンブリ38を使用している。圧力コントローラ28は、チャンバ58内の圧力を選択的にコントロールする。この具体例では、コントロールプログラムは、ロボットアセンブリ16がサブストレート34上に要素アレーをプリントするようにロボットアセンブリ1

6を制御するようにデータ処理装置で動作する。

第1段階の図5Aにおいて、プログラムはロボットアセンブリ16に命令して、ピンアセンブリ38を動かしてソースプレート20上に配置させ得る。次いで、ロボットアセンブリ16は、384ウェルのDNAソースプレートであり得るソースプレート20にピンアセンブリを浸漬する。図4に示すように、ピンアセンブリは、ピンアセンブリ50が16個のピンを384ウェル-DNAソースプレートの16個の異なるウェルに浸漬するように16個のピンを含み得る。次いで、データ処理装置12はモーションコントローラ14に命令して、ロボットアセンブリ16を操作してピンアセンブリを動かし、サブストレート34の表面上に配置され得る。サブストレート34は材料のサンプルを受容するのに適した任意のサブストレートであり得、シリコン、プラスチック、金属または他の適当な材料から形成され得る。場合により、サブストレートは平坦な表面を有するが、ピット付き表面、ウェルを有するエッチングされた表面または他の適当な印刷面をも含み得る。次いで、データ処理装置12で動作するプログラムはロボットアセンブリを命令し、モーションコントローラ14を介して圧力コントローラ28に

指示して内部チャンバ58内に正圧を生成する。この場合、内部チャンバの正圧により、ベシクル62の保持チャンバからの流体に圧力が加えられ、流体はベシクルからサブストレート90の各ウェル92に放出される。

データ処理装置12で動作するプログラムはまたコントローラ14に命令して

28により内部チャンバ58内に加えることができる。正圧により形成される下向きの力を用いて、上向きの毛管力を相殺することができる。このようにして、毛管作用によりベシクルの保持チャンバに抜き取られる流体の容量が調整され得る。

図5Bには、ニードルの保持チャンバ内の流体がスエーヅロック80を通り抜けて延びる中央径88を介して加えられるわずかに正の圧力により分配されることが示されている。内部チャンバ58に加えられる正圧を調整することにより、流体はスプレーとしてまたはニードル先端での液滴形成により放出され得る。液滴対スプレーの分配比率を左右する1因は圧力コントローラ28により加えられる圧力である。1つの具体例では、10〜1000トル大気圧の圧力が加えられる。

このために、データ処理装置12は、分配される流体の容量を制御し調整するコンピュータプログラムを動かすことができる。前記プログラムはコントローラ28に命令して、特定量の流体をスプレーを生成するかまたはベシクルの末端で液滴を形成することにより放出させ、前記プログラムはサブストレート表面に流体を分配させるためにサブストレート表面と接触させることができる。

図5C及び5Dには、図5A〜5Bに示した初期段階を再び実施し得ることが示されている。ただし、ここでのサブストレート表面上の位置は初期の位置とはずれている。図示した方法では、ピンツールは、2つのウェル92間の距離に等しい距離だけずれている。本発明の範囲を逸脱しないでのオフセット印刷技術を使用することができることは自明である。

図2に示すピンアセンブリにより幾つかの利点が得られることは十分理解される。例えば、分配操作の間のすばが簡単であり、1回もしくはそれ以上のピンの充填及びすば溶液による排出操作のみを必要とするだけである。また、保持チャンバすべてが十分容量まで充填されるので、分配される容量の精度がニードルの内径によつてのみ異なるだけである。なお、ニードルの内径はピン作成中に注意深くコントロールされ得る。更に、デバイスが費用効果的である。デバイスの中で最も高価なのはニードルであるが、ニードルは表面と接触させる必要がな

、圧力コントローラ28をコントロールして保持チャンバのソースプレート20由来のソース材料による充填を制御する。圧力コントローラ28は、ピンアセンブリの内部チャンバ内に負圧を生じさせ得る。こうすると、流体はベシクル62a-62dの保持チャンバに抜き取られる。圧力コントローラ28は、流体が保持チャンバから流出して内部チャンバ58にこぼれ出るのを避けるために開ループまたは閉ループ制御により圧力を調節することができる。圧力をコントロールするためのループ制御システムは当業界で公知であり、任意の適当なコントローラを使用することができる。特にソースプレート20から抜き取られたソース材料がウェル毎に異なる場合には、前記のように溢出物により相互汚染が生じ得る。

本発明の代替実施例では、保持チャンバ64a-64dの各々は十分に小さく、チャンバを毛管作用により充填できる。

この実施例では、ピンアセンブリは、下部ブロック54の孔を通り抜けて延びる細い径ニードル、例えばステンレススチールニードルのアレーから構成される。ソース溶液に浸漬したニードルは毛管作用により充填される。1つの実施例では、大気圧下で充填される毛細管の長さは、ほぼ下記式により決められる。

$$H = (2\gamma) / (PGR)$$

上記式中、Hは高さ、 $\gamma$ は表面張力、Pは溶液密度、Gは重力、Rはニードルの半径を示す。各ベシクルにより保持される流体の容量は、内径の直径を選択することにより調整され得る。室温において水は半径100 $\mu$ mの毛細管に長さ15cmまで充填されることに留意されたい。よって、短い径ナノリッターニードルは十分容量まで満たすであろうが、毛管力が十分に小さく、ニードルオリフィスの上部にメニスカスが形成されると考えられるので溢出することはない。これにより、溢出物による相互汚染が防止される。1つの具体例では、ピンアセンブリのベシクルは、容量の異なる流体を保持し分配するためにサイズの異なる内部チャンバを備えることができる。

別の具体例では、ベシクルの保持チャンバに抜き取られる液体容量を減らすために、わずかに正の圧力を圧力コントローラ

いので、ニードルはほとんど物理的歪みもしくは応力を受けず、取り替え回数を減らし寿命を長くするからである。

また、サブストレート表面にサンプル材料を付着させる方法として、ブロックから伸長している固体ピン要素を有するピン

ツールアセンブリを使用する方法が図示され、この方法ではロボットアームがピンアセンブリの固体ピン要素をサンプル材料のソースに浸漬し、ピンの遠位端部をサンプル材料で濡らす。次いで、ロボットアセンブリはピンアセンブリをサブストレート上のある位置に移動させた後、ピンアセンブリをサブストレート表面に当たるまで下げて、濡らせたピンのそれぞれをサブストレート表面の材料をスポットさせるための表面に当たるように接触させる。

図6A及び6Bは、サブストレートの表面上または該表面に対して材料を分配するための別の代替システムを示す。特に、図6Aは、毛細管要素112、トランスデューサ要素114及びオリフィス（図示せず）118、流体導管122及びロボットアームアセンブリに連結するマウント124、例えば図1に示すロボットアーム24を含むジェット印刷デバイス110を示す。図6Aに更に示すように、ジェットアセンブリ110はオリフィス118からサンプル材料の液滴120を放出してサンプル材料を表面128上に沈着させるのに適している。

ジェットアセンブリ110の毛細管112は、ガラス毛細管、プラスチック毛細管、または液体サンプルを運ぶことができ、

流体サンプルをトランスデューサ要素、例えばトランスデューサ要素114の作用により放出させることができる他の適当なハウジングであり得る。図6Aに示すトランスデューサ要素114は、毛細管112のパラメータの周りに形成し且つロボットアセンブリ16内のパルス発生装置から受けた電気パルスを変換して流体を毛細管112のオリフィス118から放出させ得る圧電トランスデューサ要素である。圧電トランスデューサ要素を有するジェットアセンブリの1つは、ドイツのMicroFab Technology, Inc. で製造されている。しかしながら、調整された特定量の流体を分配するのに適したジェットアセ

ンプリを本発明で使用することができ、例えば圧電トランスデューサ、電気トランスデューサ、電気制限トランスデューサ、磁気制限トランスデューサ、電気機械トランスデューサまたは他の適当なトランスデューサ要素を使用することができる。図示した具体例では、毛細管112は流体材料を受容するための流体導管122を有している。任意の具体例では、オリフィス118が流体材料ソースに沈められたときオリフィス118を介して流体を抜き取る真空圧の作用により、流体を毛細管に抜き取ることができる。本発明の範囲を逸脱し

ないで他のジェットアセンブリ110を本発明で使用することができる。

図6Bは、ロボットアセンブリ、例えば図1に示すアセンブリ1のロボットアームで実施されるpに適当な別の代替アセンブリを示す。図6Bは、相互に接続した4つのジェットアセンブリ130a-130dを示す。図2に示すピンアセンブリと同様に、図6Bに示すジェットアセンブリを流体材料を並行して分配するために使用することができる。電気工学の当業者には自明のように、特定のジェットアセンブリから流体を選択的に分配するためにジェットアセンブリ130a-130dの各々は他とは独立して操作され得る。また、ジェットアセンブリ130a-130dのそれぞれから分配される流体の容量を選択するために各ジェットアセンブリ130a-130dは独立して制御され得る。本発明の範囲を逸脱しないで図6Bに示すアセンブリに改変及び変更を加えることができる。

サンプル材料を迅速に分析する方法をも提供する。このために、サンプルアレーを上記したいずれかの方法に従ってサブストレート表面上に形成することができる。次いで、サンプルアレーを質量分析法により分析して、アレー中のサンプルの組成

を示すスペクトルデータを集める。上記した方法により調整された特定量の分析対象材料を迅速に分配できる方法が提供されることが理解される。特に、この方法によりナノリッター以下〜低ナノリッターの容量の流体を分配することができる。こうした低容量の分配方法により、質量分析に十分適したサンプルアレーが作成される。例えば、低容量であればスポット諸特性、例えば蒸発速度及び室温

で実施することができることは当業名に自明である。

配列または濃度が異なるオリゴヌクレオチドを最高3枚の別々の384ウェル—微量測定ソースプレートにウェルに充填することができる。16ウェルの1組をマトリックス溶液用に残しておくことができる。2枚のプレートのウェルに洗浄溶液を充填する。5枚の微量測定プレートにロボットアセンブリ16のステージ上に載せることができる。複数の標的サブストレートを、ステージ26上に設置した任意の組のバンキングもしくは位置決めピンに隣接して配置することができる。1組の参照軸に沿って標的サブストレートを並列させるためのものである。マトリックス及びオリゴヌクレオチドが予め混合されていないときには、所望する標的サブストレートすべてに対してまずマトリックス溶液をスポットするためにピンアセンブリを使用することができる。後続段階において、オリゴヌクレオチド溶液をマトリックス材料と同じパターンでスポットし、マトリックスを再溶解することができる。或いは、ウェル上にまずオリゴ

ヌクレオチド溶液、次いでマトリックス溶液を供給するか、またはマトリックス溶液とオリゴヌクレオチド溶液を予め混合することによりサンプルアレーを作成することができる。

サンプルアレーをサブストレート表面上に設置させた後、アレーを各種手段（例えば、UV/VIS、IR、蛍光、化学発光、NMR分析法または質量分析法のような分光分析法）を用いて分析することができる。例えば、分配プロセス後、サンプルを供給したサブストレートをMALDI-TOFソースプレート上に配置し、そこにベベルスクリー付きポリカーボネート支持体を用いて保持する。1つの例では、プレートをプローブの端部に移して飛行時間型質量分析計のソース領域の1 $\mu$ m分解能、1"行程xyステージ(Newport)上に保持する。本発明の範囲を逸脱せずに適当な質量分析計を本発明で使用することができることは当業者には自明である。

本発明のアレーと一緒に使用する好ましい質量分析計フォーマットにはイオン化(I)方法が含まれ、この非限定例としてマトリックスによるレーザー脱離(MALDI)、連続もしくはパルスエレクトロスプレー(ESI)及び関連方

や光のような大気条件に対する低依存性が再現可能となる。

図5に示す具体例で続けると、アレーは、配列または濃度が異なるオリゴヌクレオチド(0.1~50ng/111)を96ウェル—微量測定ソースプレート20のウェルに充填することにより作成され得る。第1ウェルはマトリックス容器を保持するために残しておくことができる。サブストレート34、例えばビット付シリコンチップサブストレートをロボットアセンブリ16のステージ26上に置くことができ、1組の参照軸の周りにウェルのマトリックスを配向させるために手動で整列させることができる。データ処理装置12で実行するコントロールプログラムは、ソースプレート20の第1ウェルの座標を受け取ることができる。ロボットアーム12により、16個のピ

ンの各々がウェルの1つに沈むようにピンアセンブリ38をソースプレート20に浸すことができる。各ベシクルは毛管作用により満たすことができ、こうして保持チャンバの全体が流体を受容する。場合により、データ処理装置12で実行するプログラムは圧力コントローラを命令して、保持チャンバに抜き取られる流体の容量を制限または低減させるべく毛管作用の力を部分的に補償する(offset)正の偏移力でピンアセンブリ38の内部チャンバ58を満たす。

場合により、ピンアセンブリ38をソースプレート20の同じ16個のウェルに浸し、第2の標的サブストレートにスポットすることができる。このサイクルを所望の数の標的サブストレートに対して繰り返すことができる。その後、ロボットアーム12はピンアセンブリ38を洗浄溶液38に浸し、次いでピンアセンブリをソースプレート20の別の16個のウェルに浸し、最初の組の16個のスポットからある距離離れたサブストレート標的上にスポットすることができる。この操作も所望の数の標的サブストレートに対して繰り返すことができる。全サイクルを繰り返して、各ベシクルから2 $\times$ 2アレーを作成し、8 $\times$ 8アレーのスポットを作成することができる[(2 $\times$ 2要

素/ベシクル) $\times$ 16ベシクル=64個のスポットされたエレメント]。しかしながら、本発明の範囲を逸脱しないでアレーを作成するのに適した方法を本発明

法(例えば、イオンスプレーまたはサーモスプレー)、または塊状クラ

スター衝撃(MCI)が含まれる。これらのイオン源は、線形もしくは非線形リフレクトロン飛行時間(TOF)、4倍もしくはその倍数、1個もしくはそれ以上の磁気セクター、フーリエ変換イオンサイクロトロン共鳴(FTICR)、イオントラップ及びこれらの組み合わせ(例えば、イオントラップ/飛行時間)を含めた検出フォーマットと調和させることができる。イオン化のために、複数のマトリックス/波長の組み合わせ(MALDI)または溶媒の組み合わせ(ESI)を使用することができる。例えば、ESI(Valaskovic, G. A., Science, 273:1199-1202(1996))またはMALDI(Li, L. 5, J. Am. Chem. Soc., 118:1662-1663(1996))質量分析法を用いて10<sup>-18</sup>モル以下のレベルのタンパク質を検出できた。

本発明方法では、完全に非接触、高圧スプレーまたは部分接触の低圧液滴形成モードを使用できることが理解される。後者のモードでは、液滴とウェルの壁またはサブストレート34の親水性の平坦な表面との間のみが接触している。いずれにおいてもニードル先端と表面との接触は必要でない。

好ましい態様

1つの好ましい実施態様では、シリカ支持体をアミノ官能基で官能化することにより【例えば、支持体を3-アミノプロピトリエトキシシラン(ウィスコンシン州ミルウォーキーに所在のAldrich Chemical Co.,)のような試薬を用いて誘導化することにより】、核酸分子を該支持体上に共有結合させることができる。他の官能化されたオキシシランまたはオルトシリケートを使用することもでき、これらは例えばベシルバニア州Tulitytownに所在のGelco, Inc. から市販されている。例えば、3-メルカプトプロピトリエトキシシランを使用してシリコン表面をチオール基で官能化することができる。次いで、アミノ官能化シリカをヘテロ二官能性試薬、例えばN-スクリンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIANB)(イリ

ノイ州ロックフォードに所在のPierce)と反応させることができる。使用可能な他のホモもしくはヘテロ二官能性試薬は例えばPierceから市販されている。最後に、(例えば、5'-末端が)チオール基で官能化された核酸は、核酸分子のチオール官能基と支持体のヨードアセチル官能基との反応により誘導化されたシリカ支持体に共有結合する。

特定の実施態様では、核酸を架橋剤と反応させて架橋剤/核酸結合体を形成し、次いでこれを官能化支持体と反応させて、固定化された核酸を得ることができる。代替方法として、架橋剤を核酸及び官能化固体支持体とを1つの容器で合わせて、架橋剤と核酸及び固体支持体を実質的に同時に反応させることもできる。この実施態様では、通常ヘテロ二官能性架橋剤、即ち核酸及び官能化固体支持体のいずれかと選択的に反応し得る2つの異なる反応性官能基を有する架橋剤を使用する必要がある。

本発明方法は、不溶性支持体上に固定化された核酸の空間的アドレス可能なアレーを作成するために有用である。例えば、本発明方法は、アレーに配列されたピン上に固定化された異なる核酸のアレーを作成することができる。別の実施態様では、固体支持体上の光開裂可能な保護基を(例えば、写真平版により)選択的に開裂させて、核酸の固定化のための活性化された表面部分を得ることができる。例えば、チオール基を与えるべく3-メルカプトプロピルトリエトキシシランで処理して修飾させたシリコン表面を光開裂性保護基(光開裂性保護基の例については、例えばPCT国際公開WO92/10092、またはMcCrayら、Ann. Rev. Biophys. Bio

phys. Chem., 18:239-270(1989)を参照されたい)でブロックすることができ、表面の特定領域を例えば写真平版マスクを用いて照射することにより選択的に脱ブロックすることができる。次いで、チオール反応性基を含むように修飾された核酸は支持体に直接結合させることができ、またはチオール反応性架橋剤をチオール修飾支持体と反応させた後(または実質的に同時に)核酸と反応させて、固定化核酸を得ることができる。本発明方法に従って支持

面をも含むことができる。

本発明のキットは任意に、適切な緩衝液、試薬を保存するための容器及び/または使用指示書を含むことができる。

更に別の実施態様では、核酸と共有結合させた不溶性支持体、例えば立体アドレスもしくは前アドレス可能なアレーフォーマットの全表面を各種固相核酸化学用途【この非限定例として、(化学的及び酵素的)核酸合成、ハイブリダイゼーション及び/またはエクステンションが挙げられる】または核酸検出及び多形性分析に基づく診断方法【例えば、米国特許第5,605,798号明細書】において使用することができる。従って、本発明は更に核酸分子の反応方法をも提供し、この方法では、核酸分子のチオール含有誘導体をチオール反応性基を含む不溶性支持体と反応させることにより、またはチオール含有不溶性支持体を核酸分子のチオール反応性基含有誘導体と反応させ、その後更に固定化された核酸分子と反応させることにより、核酸分子を表面上に固定化する。

特定実施態様では、固定化された核酸を更に、該固定化核酸

またはその一部に相補的な核酸とハイブリダイズすることにより反応させる。別の実施態様では、固定化された核酸を更に、該固定化核酸またはその一部にハイブリダイズされる核酸をエクステンションさせることにより反応させる。このようなエクステンション反応は例えば、本発明方法により不溶性支持体に固定化されたDNA分子を配列決定する方法において使用することができる。従って、本発明はサブストレート上のDNA分子の配列を決定する方法をも提供し、この方法では、DNA分子のチオール含有誘導体をチオール反応性基を含有する不溶性支持体の表面上に固定し、固定化DNAの一部に相補的な一本鎖核酸とハイブリダイズし、その後1つもしくはそれ以上のジデオキシヌクレオチドの存在下でDNA合成を実施する。

本発明を、下記実施例を参照して更に説明する。これら実施例は単に例示にすぎず、本発明を限定するものと解釈すべきでない。本明細書で引用した全ての文献(参照文献、特許明細書、公開明細書及び係属中の特許出願明細書を含む)の開示内容は本明細書中に援用されるものとする。

体上に固定化された核酸塩基または配列を更に公知の方法により修飾することができる。例えば、組合せ技術を含めた慣用技術に従って固相核酸合成を実施することにより核酸配列を延長させることができる。

核酸を含む不溶性支持体を提供する。好ましくは、核酸を少なくとも1個の硫黄原子を介して不溶性支持体の表面に共有結合させる。すなわち、核酸を少なくとも1個の硫黄原子を含むリンカー部分を介して表面に共有結合させる。前記のように共有結合させた核酸は、本明細書に記載の方法により容易に製造することができる。不溶性支持体は、ハイブリダイゼーションや配列決定を含めた各種用途で使用され得る。用途については

実施例に例示する。

好ましい実施態様において、共有結合させた核酸は、少なくとも約20 fmol/mm<sup>2</sup>、より好ましくは少なくとも約75 fmol/mm<sup>2</sup>、更に好ましくは少なくとも約100 fmol/mm<sup>2</sup>、もっと好ましくは少なくとも約150 fmol/mm<sup>2</sup>の密度で不溶性支持体の表面上に存在させる。

また、上記した固体支持体に共有結合させた固定化核酸の組合せライブラリーを提供する。

更に、固体支持体上に核酸を固定化させるキットを提供する。1つの実施態様では、前記キットは適量のi)チオール反応性架橋剤及びii)表面を前記チオール反応性架橋剤と反応し得る(好ましくはチオール以外の)官能基で修飾するための表面修飾剤を含む。前記キットは任意に、核酸を固定化する際に使用される不溶性支持体、例えば磁性マイクロビーズのような固体表面を含むことができる。前記キットは、核酸をチオール官能基で修飾するための試薬をも含む得る。

別の実施態様では、前記キットは、支持体の表面をチオール部分で修飾するための試薬及び支持体のチオール部分と反応し

得るチオール反応性架橋剤を含む。特定実施態様では、前記キットは核酸を固定化する際に使用される不溶性支持体、例えば磁性マイクロビーズのような固体表

#### 実施例1

DNAのシリコンウェハへの高密度結合

#### 材料及び方法

特記しない限り、試薬はすべてウィスコンシン州ミルウォーキーに所在のAldrich Chemicalから入手した。

#### シリコン表面作成

シリコンウェハをエタノールで洗浄し、ブンゼンバーナーで殺菌し、トルエン中に2.5容量%の3-アミノプロピルトリエトキシシランを含む無水溶液に3時間浸漬した。次いで、シラン溶液を除去し、ウェハをトルエンで3回、ジメチルスルホキシド(DMSO)で3回洗浄した。次いで、ウェハを無水DMSO中にN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)(イリノイ州ロックフォードに所在のPierce Chemical)の10 mM無水溶液中でインキュベートした。反応後、SIAB溶液を除去し、ウェハをDMSOで3回洗浄した。

ウェハの固体支持体上でSIABとアミノ基の縮合をモニターすることは不可能であったので、反応を溶液中で実施し、最適反応時間を調べた。2つの出発材料を分離できる95:5クロロホルム:メタノール(ニュージャージー州フィリップスバーグに所在のBaker)を用いる薄層クロマトグラフィー(T

LC)(254 nm蛍光インジケータを備えたガラス裏打ちシリカプレート)(ニュージャージー州フィリップスバーグに所在のBaker)を使用した。SIAB出発材料は長波長紫外光(302 nm)で可視化できた。3-アミノプロピルトリエトキシシランは紫外光の下では不活性であった。従って、プレートに第1級アミンと反応するニンヒドリン溶液をスプレーすると、加熱により紫色スポットが現れた。微量規模反応を、3-アミノプロピルトリエトキシシランに比して僅かにモル過剰のSIABを使用してクロロホルム/DMSO中で実施し、上記TLC条件でモニターした。

オリゴヌクレオチド修飾

3'-または5'-ジスルフィド含有オリゴデオキシヌクレオチド(カリフォルニア州アラメダに所在のOperon Technologiesまたはオレゴン州ウィルソンビルに所在のOligo Etc.)由来のジスルフィドの還元を、逆相FPLC(ニュージャージー州ピスカタウェーに所在のPharmacia)を用いてモニターした。シフトをジスルフィド開裂時のオリゴデオキシヌクレオチドの保持時間で見ることができる。最適条件を調べるために各種還元方法を試験した。

1つの方法では、ジスルフィド含有オリゴデオキシヌクレオチド(31, 5nmol, 0.5mM)をpH8.0及び37℃でジチオトレイトール(DTT)(イリノイ州ロックフォードに所在のPierce Chemical)(6.2mmol, 100mM)とインキュベートした。開裂反応が実質的に完了したら、遊離チオール含有オリゴデオキシヌクレオチドをChromaspin-10カラム(カリフォルニア州バロアルトに所在のClontech)を用いて単離した。なぜならば、DTTは後続の反応で競合する恐れがあるからである。代替方法として、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)(イリノイ州ロックフォードに所在のPierce Chemical)を使用してジスルフィドを開裂させた。ジスルフィド含有オリゴデオキシヌクレオチド(7, 2nmol, 0.36mM)をpH4.5の緩衝液中37℃でTCEPとインキュベートした。TCEPはヨードアセトアミド官能基と競合反応しないので、反応後生成物を単離する必要はなかった。開裂反応のために各種濃度のTCEPを使用して結合反応のために最適な条件を調べた。ブローブカップリング

上記したようにヨードアセトアミド官能基を含むように誘導化させた各ウェハに対して、100mMリン酸緩衝液(pH8)中に遊離チオール含有オリゴデオキシヌクレオチドを含む10mM水溶液を添加した。反応を室温、100%相対湿度で最低5時間実施した。反応後、オリゴデオキシヌクレオチド溶液を除去し、ウェハを50%ホルムアミド(オハイオ州クリーブランドに所在のUSB)

Amer sham)とインキュベートした。40単位のT4ポリヌクレオチドキナーゼを添加後、反応を37℃で1時間実施した。バイアルを75℃の水浴に10分間浸漬することにより反応を停止した。次いで、生成物をChromaspin-10カラム(カリフォルニア州バロアルトに所在のClontech)を用いて単離した。

共有的に固定化したブローブの濃度を測定するために、特定のジスルフィド含有オリゴデオキシヌクレオチドを痕跡量の上記したように放射線標識した同じ物質に添加した。ジスルフィドを開裂し、ブローブをヨードアセトアミド官能化したウェハに固定化し、ウェハを洗浄後ホスホリメジャー(phosphorimager)スクリーン(カリフォルニア州サンバールに所在のMolecular Dynamics)にかけた。使用したそれぞれ異なるオリゴデオキシヌクレオチドに対して、オリゴデオキシヌクレオチドのモル量が既知の参照スポットをポリスチレン上に作成した。3つの基準スポットを同様にホスホリメジャースクリーンにかけた。スクリーンを走査して、各チップに結合したオリゴデオキシヌクレオチドの量(mole)を基準の特定活性に対してカウントを比較することにより

測定した。

ハイブリダイゼーション及び効率

固定化ブローブで官能化させたウェハに対して、1M NaCl及びTE緩衝液中に相補的配列(10μM)を含む溶液を添加した。ウェハ及び溶液を75℃に加熱し、3時間かけて室温まで放冷した。その後、溶液を除去し、ウェハをTE緩衝液で2回洗浄した。

ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの量を測定するために、ブローブをまづ<sup>32</sup>Pよりむしろ<sup>35</sup>Sで標識すること以外は上記と同様にして固定化した。固定化したブローブの密度をホスホリメジャーを用いて測定した。次いで、同じウェハをTE緩衝液、1M NaCl及び<sup>32</sup>Pで放射線標識したその相補的鎖(10μM)中でインキュベートした。上記したようにハイブリダイゼーションを実施した。洗浄して非特異的結合を除去後、ウェハ及び基準を、スクリーンとウ

を含む5×SSC緩衝液(75mMクエン酸ナトリウム、750mM塩化ナトリウム、pH7)で2回洗浄した。

ブローブ濃度の放射化学測定

表面に共有結合したDNAの量及びハイブリダイズされる相補的配列の量を測定するために、放射線標識したブローブを使用した。5'-ジスルフィド含有オリゴデオキシヌクレオチドを固定化する場合、3'末端をターミナルトランスフェラーゼ酵素及び放射線標識したジデオキシヌクレオシドトリホスフェートを用いて放射線標識した。標準反応では、15pmol(0.6μM)の5'-ジスルフィド含有オリゴデオキシヌクレオチドを、0.2mMの2-メルカプトエタノールの存在下で50μCi(16.5pmol, 0.66μM)の[α-<sup>32</sup>P]ジ

デオキシアデノシン-5'-トリホスフェート(ddATP)(イリノイ州アーリントンハイツに所在のAmersham)とインキュベートした。40単位のターミナルデオキシヌクレオチルトランスフェラーゼ酵素(オハイオ州クリーブランドに所在のUSB)を添加し、反応を37℃で1時間実施した。その後、バイアルを75℃の水浴に10分間浸漬することにより反応を停止し、生成物をChromaspin-10カラム(カリフォルニア州バロアルトに所在のClontech)を用いて単離した。同様に、5'-ジスルフィド含有オリゴデオキシヌクレオチドを<sup>35</sup>Sで放射線標識した。

3'-ジスルフィド含有オリゴデオキシヌクレオチドを固定化する場合、5'末端をT4ポリヌクレオチドキナーゼ及び放射線標識したヌクレオシドトリホスフェートを用いて放射線標識した。例えば、15pmol(0.6μM)の3'-ジスルフィド含有オリゴデオキシヌクレオチドを、50mMトリス-HCl(pH7.6)、10mM MgCl<sub>2</sub>及び10mM 2-メルカプトエタノールの存在下で50μCi(16.5pmol, 0.66μM)の[γ-<sup>32</sup>P]アデノシン-5'-トリホスフェート(ATP)(イリノイ州アーリントンハイツに所在の

エハの間に銅ホイルを有するホスホリメジャーにかけた。<sup>32</sup>P信号は自由に通過し得るが、<sup>35</sup>Sからの信号をブロックするために銅ホイルを使用する。次いで、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドのモル量を測定し、よってハイブリダイゼーションのために

利用可能な共有的に固定化したブローブの割合を示す。

MALDI-TOS質量分析

上記したように、非放射線標識した固定化オリゴデオキシヌクレオチド(名称TCUC;配列GAATTCGAGCTCGGTACCCGG;分子量6455Da;配列番号1)を含有するウェハを合成し、相補的配列(名称MJM6;配列CCGGGTACCGAGCTCGAATTC;分子量6415Da;配列番号2)をハイブリタイズした。ウェハをカチオン交換用50mMクエン酸アンモニウム緩衝液中で洗浄してDNA骨格上のナトリウムイオン及びカリウムイオンを除去した(Pieles, Ura, Nucl. Acids Res., 21:3191-3196(1993))。3-ヒドロキシピコリン酸のマトリックス溶液(3-HPA, 50%アセトニトリル中0.7M 10%クエン酸アンモニウム;Wu, K. J.ら, Rapid Commun. Mass Spectrom., 7:142-143(1993))をウェハ上にスポットし、室温で乾燥させた。ウェハを、導電性テープを用いてFinnigan MAT(ドイツのBremen)Vision 2000レフレクトロンTOF質量分析計のサンプルブローブに直

接取り付け付けた。レフレクトロンは5keVイオン源及び20keVポストアクセレレーションを有する。窒素レーザーを使用した。スペクトルはすべて正のイオンモードで得た。

結果

表面化学

標準の二酸化ケイ素修飾化学を用いて、シリコンウェハを3-アミノプロピルトリエトキシシランと反応させて表面上に第1級アミノ基の均一層を形成した。

図7に示すように、次いで表面をヘテロ二官能性架橋剤に接触して表面上にヨードアセトアミド基を形成した。TLCを用いて、溶液中の上記反応の最適反応時間を決定することができた。S I A B架橋剤を長波紫外光(302 nm)の下で可視化すると、 $R_f$ 値が0.58のスポットが見られた。3-アミノプロピトリエトキシシランは紫外光の下で不活性であった。従って、ニンヒドリンを使用すると、基線に第1級アミンが存在することを示す紫色スポットが現れた。3-アミノプロピトリエトキシシランに比して僅かに過剰モルのS I A Bを使用して微量規模反応を実施した。約1分後のTLC分析で、長波長紫外光の下で目に見える $R_f$ 値が0.28の新しいスポットが認められた。ニンヒドリンを

スプレーしても紫色スポットは生じず、よって3-アミノプロピトリエトキシシラン出発物質は全て反応で消費された。UV光は、過剰のS I A Bは反応後残存していることを示した。これらの結果から、約1分後に反応は完了することが分かった。いずれの場合にも、不安定なヨードアセトアミド官能基の加水分解を最小限とすべくヨードアセトアミド官能化したウェハは直ちに使用した。ヨードアセトアミド官能基は感光性であるので、ウェハの取り扱いはずべて暗室で行った。

修飾したオリゴヌクレオチドのジスルフィド還元を、逆相FPLCでの保持時間のシフトを観察することによりモニターした。DTT(100 mM)またはTCEP(10 mM)の存在下で5時間後、ジスルフィドが遊離チオールに完全に還元されたことが判明した。DTT反応をより長く実施した場合、遊離チオールの対が反応してオリゴヌクレオチド二量体が形成された。前記した二量化反応は、開裂反応が完了後DTTを除去したときにも見られた。TCEPを開裂試薬として使用したときには二量化反応は見られなかった。なぜならば、この反応はpH4.5で実施されるので遊離チオールは完全にプロトン化され、二量化が阻止されるからである。

ジスルフィド開裂後直ちに、修飾したオリゴヌクレオチドをヨードアセトアミド官能化ウェハとインキュベートした。チオールを完全に脱プロトン化させるた

上記したような標準MALDI条件で分析した。分析により、アニールした鎖(MJM6)のみが質量/電

荷数実験値が6415.4の質量スペクトルで観察された。質量/電荷数の理論値は6415である(図9)。6455の質量/電荷数で信号はなかったが、ウェハ結合鎖(TCUC)は脱離せず、よってヨードアセトアミド結合はレーザーに耐えるに十分な安定性を有しており無傷のままであることが判明した。6262.0の質量/電荷数で別の信号が観察された。この信号はグアノシンの脱プリン化により生じた。なぜならば、DNAがMALDIプロセス中にプリン塩基の損失を受けやすいことは公知であるからである(Nordoff, E.ら, Rapid Commun. Mass Spectrom., 6:771-776(1992))。均一な分布は良好なスポットを得るのに必要であったが、ウェハ上のサンプル結晶は均一に分布されていなかった。この不均一性のために、質量解像度が変化するが、通常マススペクトルにおける脱離オリゴヌクレオチドの場合200~300の範囲である。1連の実験で、非相補的配列をウェハにハイブリダイズした。上記したように洗浄後のMALDI-TOF MS分析により、信号が検出されなかったことから非特異的アニーリングは最小であることが分かった。

#### 実施例2

増幅DNA標的のシリコンウェハに対する固定化

特定の増幅DNA標的配列の特定遊離チオール含有DNAフラグメントを分析するために、S I A B結合シリコンウェハを使用した。

図10に示すように、PCR反応において、112 bpヒトゲノムDNA鋳型(Genebank 寄託番号Z52259; 配列番号4)に相補的である5'-ジスルフィド結合含有23量体オリゴデオキシヌクレオチド(Operon Technologiesから購入; 配列番号3)をプライマーとして、ゲノムDNAの5'末端部分に相補的な市販の49量体プライマー(Operon Technologiesから購入; 配列番号5)と一緒に使用し、DNA二重らせ

めに、カップリング反応をpH8.0で実施した。このシリコンウェハの化学により達成されるプローブ表面密度を放射線標識プローブ及びホスホロイメジャーを用いて分析した。また、プローブ表面密度をジスルフィド開裂反応で使用したTCEP濃度の関数としてモニターした(図8)。ジスルフィドを開裂するために10 mM TCEP及び上記した他の反応条件を用いると、表面1 mm<sup>2</sup>当たり250 fmolの表面密度を再現可能に得ることができた。オリゴヌクレオチドプローブがチオール修飾を欠いている以外は上記と同じ実験を実施した。表面1 mm<sup>2</sup>当たり5 fmol未満の表面密度では、図7に示すように非特異的結合は最小であり、プローブカップリングが起こりそうであることを示す。

#### ハイブリダイゼーション

上記したように<sup>35</sup>S-標識プローブをウェハの表面に結合し、結合体密度を測定した後、<sup>32</sup>P-標識オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションを実施した。ハイブリダイゼーション効率及び密度をホスホロイメジャー及び銅ホイルを用いて測

定した。銅フォイルは<sup>35</sup>S信号の98.4%をブロックし、<sup>32</sup>P信号を十分に検出できることが実験的に判明した。相補的配列は再現可能にハイブリダイズして、表面1 mm<sup>2</sup>当たり105 fmolが生じた。これは、ハイブリダイゼーションに利用可能な結合プローブの約40%に相当する。このスキームで同様に非相補的配列を使用した場合には、非特異的結合は表面1 mm<sup>2</sup>当たり5 fmol未満であった。

平坦な表面上に密に詰め込まれたオリゴヌクレオチドの間の立体障害はハイブリダイゼーション効率を40%以上阻害すると仮定される。このことを考慮して、スパーサー分子をオリゴヌクレオチドのハイブリダイズ領域の末端と支持体との間に挿入した。選択したスパーサーは長さが3~25のポリdT配列であった。上記サンプルを放射線標識及びホスホロイメジャーを用いて試験すると、ハイブリダイゼーションが最高40%達成されることが判明した。

#### MALDI-TOF MS分析

ウェハをプローブで官能化し、相補的配列をハイブリダイズし、サンプルを

ん(配列番号6)の1本鎖にのみ結合させた5'-ジスルフィド結合を含む135 bp DNA産物を増幅させた。

PCR増幅反応をAmplitaq Goldkit(Perkin Elmerカタログ番号808-0249)を用いて実施した。簡単に説明すると、200 ngの112 bpヒトゲノムDNA鋳型を、製造業者から提供された緩衝液中で10 µMの23量体プライマー、8 µMの市販の49量体プライ

マー、10 mMのdNTP類、1単位のAmplitaq Gold DNAポリメラーゼとインキュベートし、PCRをサーモサイクラーで実施した。

生じたPCR産物の5'-ジスルフィド結合を実施例1に記載したように10 mMのTCEPを用いて還元して、遊離5'-チオール基を生じさせた。遊離チオール基を含むDNA鎖を、図7に本質的に概説するようにしてS I A Bリンカーを介してシリコンウェハの表面に結合させた。

135 bpのチオール含有DNAを結合したシリコンウェハを相補的12量体オリゴヌクレオチド(配列番号7)とインキュベートし、特異的にハイブリダイズしたDNA断片をMALDI-TOF MS分析により検出した。質量スペクトルは、質量/電荷数の実験値が3618.33の信号を示した。12量体オリゴマー配列の質量/電荷数の理論値は3622.4 Daである。

こうして、5'-ジスルフィド結合を含む特定のDNA標的分子を増幅させることができる。この分子を本明細書に記載の方法を用いてS I A B誘導化シリコンウェハに固定し、特定の相補的オリゴヌクレオチドを前記標的分子にハイブリタイズし、

MALDI-TOF MS分析法を用いて検出することができる。

#### 実施例3

ApoE遺伝子におけるスペクトロチップ突然変異体検出

本実施例では、診断目的での野生型及び突然変異アポリポタンパク質E遺伝子の検出のための固定化鋳型のハイブリダイゼーション、プライマーエクステンション及び質量分析を記載する。本実施例では、特定配列を含む固定化DNA分子

を、非標的アレレ特定プライマーのプライマーエクステンション及びエンステーション産物の質量分析法による分析を用いて検出、区別できることを立証する。

3' - 一遊離チオール基を含む、野生型アポリボタンパク質E遺伝子のアレレ3のコーディング配列に相補的な50塩基合成DNA鎖型：

5'-GCCTGGTACACTGCCAGGCGCTTCGACGGTCATCGGCATCGCGAGGAG-3'

(配列番号17)

またはコドン158にG→Aトランジションを有する突然変異アポリボタンパク質E遺伝子に相補的な50塩基合成DNA鎖型：

5'-GCCTGGTACACTGCCAGGCGCTTCGACGGTCATCGGCATCGCGAGGAG-3'

(配列番号18)

をカップリングして、図7に本質的に概説し、実施例1及び2に記載したS1A B誘導化シリコンウェハを分離した。

21量体オリゴヌクレオチドプライマー：

5'-GAT GCC GAT GAC CTG CAG AAG-3' (配列番号19)

を各固定化鎖型にハイブリダイズし、プライマーを市販のキット(例えば、U. S. Biochemical Corp. のシークエナーゼまたはサーモシークエナーゼ)を用いて延長させた。製造業者の指示に従って緩衝液中、3つのデオキシリボヌクレオシドトリホスフェート(dNTPs；dATP、dGTP、dTTP)及びジデオキシリボヌクレオシドシントリホスフェート(dCTP)の存在下でシークエナーゼDNAポリメラーゼまたはサーモシークエナーゼDNAポリメラーゼを添加すると、野生型アポリボタンパク質E遺伝子をコードする固定化鎖型に結合した21量体プライマーが1塩基延長し、突然変異アポリボタンパク質E遺伝子をコードする固定化鎖型に結合した21量体プライマーが3塩基延長した。

上記ウェハを本明細書に記載した質量分析法により分析した。

野生型アポリボタンパク質E配列では、質量/電荷数が6771.17Da(質量/電荷数の理論値6753.5Da)の1塩基延長したプライマー(22量体

；充填、取り出し、分配及び洗浄のために毛細管を移動させるためのロボットxyzステージ及びロボットドライ

バ；「保留(suspended)」液滴特性を目視可能にするためのストロボスコープ及び圧電要素の周波数でパルスを出すドライバ；ソース及び指定プレートまたはサンプル標的のための別個のステージ(すなわち、Siチップ)；指定プレートへの充填を目視するためのロボットアームに取り付けたカメラ；及び圧力ユニット、xyzロボットアーム及び圧電ドライバを制御するデータステーションを含み得る。

#### 並行分配ツールの説明

ロボットピンツールは、プローブブロック内に収容され且つX、Y、Zロボットステージ上に設置された16個のプローブからなる。ロボットステージは、ロボットアームの下にサンプルトレイを配置することができるガントリーシステムであった。前記ガントリーユニットそれ自体は、リニアオプティカルエンコーダにより与えられる位置フィードバックを有するブラシレスリニアサーボモーターにより案内される、それぞれ250mm及び450mm移動するX及びYアームからなる。Z軸(鉛直に50mm移動)により駆動される鉛スクリューがガントリーユニットのxy軸側に取り付けられており、モーター駆動ロータリーオプティカルエンコーダによる位置フィードバックを有

するインラインロータリーサーボモーターにより制御される。システムの作動域には、5枚の微量測定プレート(最も一般的には、最高1152の異なるオリゴヌクレオチド溶液に対して2枚の洗浄溶液プレート及び3枚のサンプルプレート)及び最高10枚のウェハを保持するスライドアウトツールプレートが設けられている。ウェハは2つの裏打ちピンに対してプレート内に正確に配置され、真空により確実に固定されている。システム全体は安全のためにプレキシガラスハウジング内に収容されており、熱及び振動を抑制するためにスチール支持フレーム上に設置されている。動作のコントロールは3軸サーボコントローラであり、コンピュータに統合される市販のモーションコントローラを使用することにより遠成

を質量/電荷数が6499.64Daの元の21量体プライマーを区別する質量スペクトルが生じた。突然変異型アポリボタンパク質E配列では、質量/電荷数が7386.9Da(質量/電荷数の理論値7386.9Da)の3塩基延長したプライマー(24量体)を質量/電荷数が6499.64Daの元の21量体プライマーを区別する質量スペクトルが生じた。

#### 実施例4

連続及び並行分配ツールを用いるDNAアレーの作成

マトリックスによるレーザー脱離イオン化質量分析のために、ロボット駆動式連続及び並行pL-nL分配ツールを用いて平坦なまたは幾何学的に変更を加えた(例えば、ウェルを有する)表面を有する<1平方インチチップ上に10~10<sup>3</sup>エレメントDNAアレーを作成した。前者では、圧電ピペット(内径70μmの毛細管)で~0.2nLのマトリックス液滴をチップ上に一回もしくは複数回分配した後分析した。この方法を用いて、0.2fmol程度の36量体DNAからスペクトルを得

た。急速に(<5秒)蒸発するが、分析対象物を含む3-ヒドロキシピコリン酸マトリックスの微結晶が通常生成され、よって大容量作成で通常得られるよりも高い再現性が得られた。100個の800μmウェル中の5fmolの23量体のスポットの全てで信号/ノイズ比が>5の99/100親イオン信号を有する容易に解釈される質量スペクトルが得られた。第2の方法では、384ウェル微量測定プレートからのプローブを、表面接触によりチップ上に~20nLを移すスプリング付きピンのアレーを用いてチップウェルまたは平坦な表面に一度に分配する。並行方法で沈着させたアレーエレメントのMS分析は、感度及び解像度の点で連続方法に匹敵する。

#### 圧電連続分配ツールの説明

実験システムは北ドイツに所在のMicrodrop GmbHから購入したシステムを改良したものであり、分配すべき溶液を保持するガラス毛細管に結合しその周りの圧電要素にパルス信号を送る圧電要素ドライバ；毛細管に(負圧により)充填または毛細管を(正圧により)空にするための圧力トランスデューサ

される。特定の用途のためのプログラムコードが所要により書かれている。

サンプルを連続システムにより、MALDI-TOF分析において標的として機能する幾つかの表面に対して分配した。前記表面は、(1)Thermo Bioanalysis Vision 2000で通常作用するために供給されている平坦なステンレススチールサンプル標的、(2)マイクロ機械加工されたナノビットを有する同じデザインのステンレススチール標的、

(3)平坦なシリコン(Si)ウェハ、(4)研磨された多平坦なSiウェハ、(5)粗い(3~6pLm特徴)ビットを有するSiウェハ、(6)化学的にエッチングした、大きさ800×800μmで深さ99~400(または(b)120)μmの複数のウェルの10×10(または(b)16×16)アレーを有する12×12(または(b)18×18)mmSiチップ、(7)化学的にエッチングした、大きさ450×450μmで深さ48~300μmの複数のウェルの28×28アレーを有する15×15mmSiチップ、(8)平らなポリカーボネートまたは他のプラスチック、(9)金及び他の金属、(10)膜、(11)金または他の導電性材料をスパッタリングしたプラスチック表面を含む。分配容量は、分配する液滴の数を調節することにより10<sup>-10</sup>~10<sup>-6</sup>Lにコントロールされる。

#### サンプル調製及び分配

##### 1. 連続

オリゴヌクレオチド(配列及び濃度の異なる0.1~50ng/μl)を96ウェル微量測定プレートのウェルに充填した。第1のウェルをマトリックス溶液用に残した。ビットを設けたチップ(MALDI標的セクションの標的6a)をステー

ジ上に置き、手で整列させた。(Windowsの)ロボット制御ソフトウェアに、第1ウェルの座標、アレーサイズ(すなわち、x×yにおけるスポット数)及びエレメント間の距離、並びに1つのアレーエレメント当たりの0.2nL液滴の数をインプットした。毛細管に~10μLのリンスH<sub>2</sub>Oを充填し、連続パルスモードでチップの一体性及び清浄度をチェックすべくストロボ発光カメラ



で目視するために自動的に移動し、空にした。次いで、毛細管にマトリックス溶液を充填し、再びストロボスコープでチェック後、平坦なもしくはピット付き表面上のアレーをスポットするために使用した。再現可能に別のMSモードで研究するために、通常0.2~2.0 n lの液滴の10×10アレーを分配した。正圧を加えて毛細管を空にし、必要によりH<sub>2</sub>Oですすぎ、0.05~2.0 μMの合成オリゴ~5 μLを抜き取るソースオリゴプレートに誘導した。次いで、毛細管を、0.2~2.0 n l水溶液を添加したマトリックススポットのそれぞれに亘って連続してラスタした。

## 2. 並行

並行プログラムは、オフセット印刷によるアレー作成をコントロールするために書かれた。10枚のウェハ上に64×64

エレメントのアレーを作成するためには、例えばツールを384ウェル-DNAソースプレートの16ウェルに浸し、標的(例えば、Si、プラスチック、金属)に移動し、サンプルを表面接触によりスポットした。次いで、ツールを同じ16ウェルに浸し、第2標的の上にスポットした。このサイクルを10枚のウェハすべてに対して繰り返した。次いで、ツールを洗浄溶液に浸し、ソースプレートの別の16枚のウェハに浸し、最初の組の16スポットから2.25 mmはずれた標的にスポットした。これを、再び10枚のウェハすべてに対して繰り返した。全サイクルを繰り返して、各ピンから2×2アレーを作成し、スポットの8×8アレーを作成した[(2×2エレメント/ピン)×16ピン=スポットされたエレメントの全数64]。

MS分析用のアレーを作成するために、配列または濃度が異なるオリゴヌクレオチドを最高3つの異なる394ウェル微量滴定プレートのウェルに充填した。16ウェルの1組をマトリックス溶液のために残しておいた。2つのプレートのウェルに洗浄溶液を満たした。5枚の微量滴定プレートをスライディングアウトツールプレート上に置いた。10枚のウェハをツールプレート上にバンクピンに接して置き、真空とした。マトリ

1の12量体(ATGG)3の51 μl溶液及び25 μlの28量体(ATGG)7の51 μl溶液を混合した。0.6 μl液滴の10×10アレーの1組を直接Finnigan Vision 2000サンプル標的ディスクに分配した。2

つのオリゴヌクレオチドの各々を750×10<sup>-18</sup>モル含む1つのアレーエレメントからMALDI-TOF質量スペクトルを得た。この方法を用いて、53量体(350×10<sup>-18</sup>モル充填、図示せず)のDNAについて解析可能な質量スペクトルが得られた。

シリコンチップの複数のウェルに微量分配したDNAからも質量スペクトルを得た。図11は、100個の化学的エッチングを施したウェルを有する12×12 mmシリコンチップを示す。マスクの大きさ及びエッチング時間は、800×800 μm(頂部表面)及び深さ100 μmのフスタム(すなわち、頂部平坦の逆ピラミッド)形状のウェルが得られるように設定した。場合により、ウェルは粗な表面またピットを有していてもよい。上記したように、毛細管に関してx及びy座標系を規定するために、チップの端をステージ上の高くなった表面に対して整列させた。(代替方法では任意に光学アラインメント、人工知能パターン認識ルーチン及びジベラーピンを用いる手動アラインメントを含み得る。)各ウェルに、分析対象物を含まない3-HPAマトリックス溶液を20滴(~5 n l)を分配した。使用した50%CH<sub>3</sub>CN溶液の場合、各液滴の蒸発時間は

5~10秒のオーダーであった。溶媒を蒸発後、微量分配された各マトリックス液滴を120倍双眼写真鏡で観察すると、非晶質で不透明なフラットディスクとして見られた。こうした外観は図3bのスペクトルに示す液滴の外観と一致する。チップを空にし、すすぎ、1.4 μmの23量体DNA(M<sub>r</sub>計算値=6967 Da)水溶液を再充填後、毛細管を100個のマトリックススポット上に誘導し、そこで5 n lのDNA水溶液を直接マトリックス液滴の上に分配した。CCDカメラを用いて可視化すると、分析対象水溶液はマトリックスと混合し、再溶解させたことが認められた(大気温度及び湿度で完全蒸発には~10秒かかった

ックス及びオリゴヌクレオチドが予め混合されていない場合には、ピンツールを用いて、まず10枚のウェハの所望のアレーエレメントのすべてにマトリックス溶液をスポットした。本実施例では、16×16アレーを作成し、こうして1.125 mmのオフセットで10枚のウェハの各々を16回スポットしなければならない。次いで、オリゴヌクレオチド溶液を同じパターンでスポットしてマトリックスを溶解した。同様にして、ウェハ上にまずオリゴヌクレオチド溶液、次いでマトリックス溶液を導入するか、またはマトリックス溶液とオリゴヌクレオチド溶液を予め混合することにより作成することができる。

## 質量分析法

いずれかの分配スキームに続いて、充填したチップを、1組のベベルスクリューを取り付けたポリカーボネート支持体を有するMALDI-TOFソースプレート上に据え付けた。前記プレートをプローブの末端上に移し、飛行時間型質量分析計のソース領域において1 μm分解度、1"移動x yステージ(Newport)上に保持した。通常18~26 kV抽出で操作される装置は、線形またはわん曲フィールド反射モード及び連続もしくは遅延抽出モードで操作され得た。

## 結果

### 圧電ピペットを用いる連続分配

飽和3FPA溶液を送達すると毛細管-空気界面で溶媒が蒸発するのでチップの閉塞が起こり得るが、マトリックスが溶液中に残り、毛細管が空になるまで維持される安定なスプレーが得られるようにDNA及びマトリックスの予混合によりマトリックスを十分に希釈する。1:1希釈(H<sub>2</sub>O中)マトリックス溶液で>>10分間の連続スプレーが可能であった。毛細管が>5分間放置されるように圧電要素を止め、圧電要素を再び動かしても、毛細管が閉塞することはなかった。

反射モードで動かすFinnigan Vision 2000 MALDI-TOFシステムにより与えられるステンレススチールサンプル標的を用いる初期実験では、サンプル標的に分配する前にマトリックス及びDNAの予混合溶液を用いた。1つの微量滴定ウェルに、50 μlの飽和マトリックス溶液、25 μ

l)。非晶質マトリックス表面は、結晶特徴が<1 μmのオーダーの真の微結晶質表面に変換した。

マトリックスの再溶解法による改良結晶化と一致して、予混合したマトリックス+分析対象物溶液の場合よりも再現性の高い質量スペクトルが得られた。100個の、23量体5 fmolのスポットの各々で、信号/ノイズ比が>5の99/100親イオン信号を有する解釈質量スペクトルが生じた(図12)。前記した再現性は試験した平坦なシリコン及び金属表面でも得られた(図示せず)。図12のスペクトルは、26 kVで操作

した線形TOF装置で得た。1重及び二重に帯電させた分子イオンを用いて左上スペクトル(ウェルk1)を内部校正し、この校正ファイルを外部校正として他の99のスペクトルすべてに適用すると、平均分子量からの標準偏差は<9 Daであった。これは、~0.1%の相対標準偏差に相当する。

### ロボットピンツールを用いる並行分配

アッセイは上記したオフセット印刷を用いて作成した。X及びYステージの速度は35インチ/秒であり、Zステージの速度は5.5インチ/秒である。サイクル時間を短縮するためにXおよびYステージを最高速度で移動させることも可能であるが、ダメージを避けるために表面がウェハと接触する前にZステージの速度を低下させなければならない。そのような軸速度では、10枚すべてのウェハに対して16エレメント(同一溶液の1つのツールキャビティ)をスポットするための適切なサイクル時間は20秒であり、256エレメントのアレーを作成するには~5.3分を要する。前記アレーに各種オリゴヌクレオチドを充填する場合、別の溶液に浸漬する前にピンチップを清潔にするために追加の洗浄ステップを設けなければならない。10枚のウェハを作成するためにサイクル時間が25秒まで、

または6.7分まで延びる。

上記ツールによるサンプル送達を、上記した放射線標識溶液及びホスホロイメージャーを用いて試験した。各ピンは約1 n lの液体を送達することが分かった

。スポット・スポットの再現性は高い。配列または濃度が異なる256のオリゴヌクレオチドエレメントのアレーを、ピンツールを用いて平坦なシリコンウェハ上に作成し、前記ウェハをMALDI-TOF MS法により分析した。

#### 実施例5

核酸アレーを作成するための高密度核酸固定化の使用

実施例1に記載の高密度結合方法を用いて、MALDI-TOF質量分析にかけやすいDNAオリゴマーのアレーを、実施例1に記載の高密度結合方法を用いてその表面上に複数位置、例えば複数の窪みまたはパッチを有するシリコンウェハ上に作成した。前記アレーに対して、ウェハの特定位置でのみ遊離チオール含有オリゴヌクレオチドプライマーを固定化した（例えば、図14参照）。アレーの各位置は3つのオリゴヌクレオチドの1つを含んでいた。異なる固定化オリゴヌクレオチドが別々に検出され区別され得ることを立証するために、3種のオリ

リゴマーの1つの相補的であり、長さの異なる3種の別個のオリゴヌクレオチドをウェハのアレーに対してハイブリダイズし、MALDI-TOF質量分析法により分析した。

オリゴデオキシヌクレオチド

相補的オリゴヌクレオチド対の1メンバーが3'-または5'-ージスルフィド結合を含んでいる（Operon TechnologiesまたはOligos, Etc. から購入）相補的オリゴデオキシヌクレオチド対3組を合成した。例えば、オリゴマー1 [d(CTGATCGTCGGATCATCTTTT-SS); 配列番号8] は3'-ージスルフィド結合を含むのに対して、オリゴマー2 [d(SS-CCTCTGGGAAGTGTGTAGTATT); 配列番号3の5'-ージスルフィド誘導体] 及びオリゴマー3 [d(SS-GAATTCGAGCTCGGTACCCGG); 配列番号1の5'-ージスルフィド誘導体] はそれぞれ5'-ージスルフィド結合を含む。

オリゴマー1〜3に相補的なオリゴヌクレオチドは、MALDI-TOF MS分析中に互いに容易に分割され得る異なる長さを有するように設計された。例えば、23量体オリゴヌクレオチド（配列番号9）はオリゴマー1の一部に相補的に合成し、12量体オリゴヌクレオチド（配列番号7）はオリゴマー

これにより固定化DNAの4×4アレーを作成した。例えば、オリゴマー1を4×4アレーの左上部のウェルの位置で結合させ、オリゴマー2は隣接の位置で結合させ、以下同様にした。完成したアレーを図14に

図示する。

ハイブリダイゼーション反応の実施にあたり、3つの相補的オリゴヌクレオチド及びネガティブコントロールのオリゴヌクレオチドを、1M NaClを補充したTE緩衝液（10mMのTris-HCl（pH8.0）、1mMのEDTA）中で各オリゴヌクレオチドにつき10μMの最終濃度で混合し、溶液を65℃で10分間加熱した、直ちに、シリコンウェハの全表面を加熱したオリゴヌクレオチド溶液800μlでフラッシュした。相補的オリゴヌクレオチドを、シリコンアレーを室温で1時間インキュベートした後4℃で少なくとも10分間インキュベートすることにより固定化オリゴマーにアニーリングした。或いは、オリゴヌクレオチド溶液をウェハに添加した後、ハイブリダイゼーションのために加熱し、放冷することもできる。各位置で共有的に固定化された特定のオリゴマーにアニーリングした相補的オリゴヌクレオチドを図15に示す。

次いで、ハイブリダイズしたアレーをカチオン交換用50mMクエン酸アンモニウム緩衝液で洗浄してDNA骨格上のナトリウムイオン及びカリウムイオンを除去した（Pileles, U. r. a, Nucl. Acids Res., 21: 3191-

3196（1993））。本明細書に記載したように、各位置に6nIアリコート（3-ヒドロキシピコリン酸のマトリックス溶液（50%アセトニトリル中0.7M 3-ヒドロキシピコリン酸-10%クエン酸アンモニウム; Wuら, Rapid Commun. Mass Spectrom., 7: 124-146（1993）参照）を圧電ビベットを用いて添加した。

溶液を室温で乾燥し、その後6nIアリコートの水を圧電ビベットを用いて各位置に添加して、室温で乾燥するとマトリックス-DNA結合体が各位置の底面上に均一結晶面を形成するように乾燥したマトリックス-DNA結合体を再懸濁

2の一部に相補的に合成し、21量体（配列番号2; 実施例1において“MJM6”と称した配列）はオリゴマー3の一部に相補的に合成した。更に、4番目の29量体オリゴヌクレオチド（配列番号10）は、3つのオリゴヌクレオチドのいずれとも相補性を欠くように合成した。この第4のオリゴヌクレオチドはネガティブコントロールとして使用した。

シリコン表面化学及びDNA固定化

(a) 4×4（16箇所）アレー

16×16ウェルアレーの形態の256個の窪みもしくはウェルを有する2×2cm<sup>2</sup>シリコンウェハを業者（テキサス州カレッジステーションに所在のAccelerator Technology Corp.）から購入した。ウェルは800×800μm<sup>2</sup>、120μm深さ、1.125ピッチであった。シリコンウェハを3-アミノプロピルトリエトキシシランと反応させて、表面上に第1級アミンの均一層を形成し、その後ヘテロ二官能性架橋剤S1Aに接触させて、表面上にヨードアセトアミド官能基を生じさせた（例えば、図7参照）。

シリコンアレーの複数位置にカップリングさせるためのオリゴマーを製造するために、各オリゴマーのジスルフィド結合を

実施例1に記載したように10mM TCEPを用いて完全に還元し、DNAを100mMリン酸緩衝液（pH8.0）中に10μMの最終濃度で再懸濁させた。ジスルフィド還元後直ちに、オリゴマーの遊離チオール基を図7に本質的に記載したブローブカップリング条件を用いてウェハ上の16箇所までヨードアセトアミド官能基にカップリングさせた。ウェハの16箇所それぞれカップリングを行うために、ウェハの全表面をオリゴヌクレオチド溶液でフラッシュせず、その代わりにウェハ上の256ウェルの16箇所（すなわち、窪み）の各々に本明細書に記載のピンツール（例えば、詳細説明の欄及び実施例4参照）を用いて〜30nIアリコートの所定通りに修飾させたオリゴマーを並行して添加して、固定化DNAの4×4アレーを作成した。

すなわち、図14に示すように、修飾オリゴマー1〜3の1つをシリコンウェハ上の256ウェルの16個の別々のウェルの各々に対して共有的に固定化し、

させた。

MALDI-TOF MS分析

MALDI-TOF MS分析を、図15に示し実施例1に実質的に記載したハイブリダイゼーションアレーの16箇所の各々に対して連続して実施した。DNAハイブリダイゼーションアレーの16箇所の各々に対して特異的にハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの質量スペクトルを図16に示す。質量スペクトルは、特定の相補的ヌクレオチド配列に対応する質量/電荷数の測定値を示す各位置の特定信号を示した。

例えば、オリゴマー1のみが結合した位置では、質量スペク

トルは23量体の質量/電荷数にほぼ等しい質量/電荷数実験値7072.4を有する主信号を示した。23量体の質量/電荷数の理論値は7072.6Daである。同様に、質量/電荷数測定値が3618.33Da（理論値3622.4Da）のアレーに対する12量体オリゴヌクレオチドの特異的ハイブリダイゼーションはオリゴマー2を結合させた位置でのみ検出され、質量/電荷数測定値が6415.4DaのMJM6の特異的ハイブリダイゼーションはオリゴマー3（理論値6407.2Da）を結合させたアレーの特定位置でのみ検出された。

ネガティブコントロールの29量体オリゴヌクレオチド（質量/電荷数の理論値8974.8Da）に対応する信号はアレーのいずれの位置でも見られなかった。このことは、特定の標的DNA分子はシリコンアレーの表面の特定位置に共有結合したオリゴマーにハイブリダイズされ得、複数のハイブリダイゼーションアクセスはMALDI-TOF MS分析法により個別にモニターされ得ることを示す。

(b) 8×8（64箇所）アレー

ウェルの16×16アレーを形成する256個の窪みまたはウェルを有する2×2cm<sup>2</sup>シリコンウェハを業者（テキサス州

カレッジステーションに所在のAccelerator Technology Corp.）から購入した。ウェルは800×800μm<sup>2</sup>、120μm深さ、

1. 125ピッチであった。シリコンウェハを3-アミノプロピルトリエトキシシランと反応させて、表面上に第1級アミンの均一層を形成し、その後ヘテロ二官能性架橋剤S1A8に接触させて表面上にヨードアセトアミド官能基を生じさせた（例えば、図7参照）。

16箇所DNAアレーの作成のための上記した方法に従って、オリゴマー1~3を256ウェルシリコンウェハ上に8×8アレーを形成する64箇所に固定化し、相補的オリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、MALDI-TOF MS分析法により分析した。図17は、MALDI-TOF分析法により連続分析した64箇所DNAアレーの質量スペクトルを示す。16箇所アレーについて示すように、固定化されたチオール含有オリゴマーの各々に対する相補的オリゴヌクレオチドの特異的ハイブリダイゼーションがDNAアレーのそれぞれの位置で観察された。

#### 実施例6

シリコンウェハ上に固定化されたDNA鎖型に結合したハイ

ブリダイズDNAプライマーのエクステンション

S1A8誘導化シリコンウェハを、米国特許第5,605,798号明細書に実質的に記載されている手順を用いる固定化DNA鎖型のプライマーエクステンション反応のために使用することができる。

図18に示すように、3'-遊離チオール基を含有する27量体オリゴヌクレオチド（配列番号11）を上記した、例えば実施例1に記載したS1A8誘導化シリコンウェハにカップリングさせた。12量体オリゴヌクレオチドプライマー（配列番号12）を固定化オリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、市販のキット（例えば、U. S. Biochemical Corp. のシークエナーゼまたはサーモシークエナーゼ）を用いて延長させた。製造業者の指示に従って緩衝液中、3つのデオキシリボヌクレオシドトリホスフェート（dNTPs；dATP、dGTP、dTTP）及びジデオキシリボヌクレオシドチミジントリホスフェート（ddTTP）の存在下でシークエナーゼDNAポリメラーゼまたはサーモシークエナーゼDNAポリメラーゼを添加すると、シリコンウェハに結合した

カップリングすることも、またハイブリダイズDNAのプライマーエクステンションせずともリンカー配列をも含み得る。

#### 実施例8

鎖置換及び固定化相補的核酸へのハイブリダイゼーションによ

る二本鎖核酸分子の検出

本実施例では、24量体プライマーを固定化し、二重らせんDNA分子の1本鎖を特異的ハイブリダイゼーションすることにより液相中で特定標の分子を増幅でき且つ二本鎖分子を検出できることを示す。

3'-遊離チオール基を含む24量体DNAプライマー-CTGATGCGTC GGATCATCT TTTT（配列番号8）を、図7に概説し、実施例1及び2に記載したS1A8誘導化シリコンウェハにカップリングさせた。

18量体合成オリゴヌクレオチド5'-CTGATGCGTCGGATCATC-3'（配列番号16）を、18量体オリゴヌクレオチドの12塩基部分に相補的な配列を有する12量体オリゴヌクレオチド5'-GATGATCCGACG-3'（配列番号12）と予混合した。このオリゴヌクレオチドミックスを75℃に加熱し、ゆっくりと室温に冷却して、二重らせん分子の形成を促した。

5'-CTGATGCGTCGGATCATC-3'（配列番号16）

3'-GCAGCGTAG-5'（配列番号12）

固定化24量体プライマーに対する二重らせん分子の12量体鎖の特異的ハイブリダイゼーションを、実施例6に記載のハ

イブリダイゼーション条件を用いて1μMの二重らせん分子を混合して実施した。

ウェハを上記した質量分析法により分析した。特異的ハイブリダイゼーションが、質量/電荷数が3682.78Daの12量体の質量スペクトルで検出された。

#### 実施例9

1-(2-ニトロ-5-(3-オ-4,4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)

まま12量体プライマーが3塩基延長した。次いで、このウェハを上記

したようにMALDI-TOF質量分析法により分析した。図18に示すように、15量体（配列番号13）と元の未延長12量体とを明確に区別する質量スペクトルが得られた。このことは特異的エクステンションがシリコンウェハの表面で実施され、MALDI-TOF MS分析法により検出され得ることを示す。

#### 実施例7

シリコンウェハ上に固定化したDNA鎖型に結合したハイブリダイズDNAプライマーのポリメラーゼエクステンションに対するリンカー長さの影響

S1A8誘導化シリコン表面と標的DNAのハイブリダイゼーションにより形成された二重らせんDNAとの距離の固定化されたオリゴマー鎖型に対する影響及び酵素の選択を調べた（例えば、図19参照）。

2つのS1A8誘導化シリコンウェハを、3-塩基ポリdTスペーサー配列を3'末端に挿入した以外は同一のDNA配列の2つの遊離チオール含有オリゴヌクレオチド（配列番号8及び11）の3'末端に結合させた。上記した2つのオリゴヌクレオチドを合成し、その各々をS1A8架橋剤を介してシリコ

ンウェハの表面に別々に固定化した（例えば、図7参照）。各ウェハを、75℃で変性し、シリコンウェハをゆっくり冷却することにより両オリゴヌクレオチドに共通のヌクレオチド配列部分と相補的な12量体オリゴヌクレオチド（配列番号12、14及び15）とインキュベートした。次いで、ウェハを上記したようにMALDI-TOF質量分析法により分析した。

図18に示すように、二重らせんと表面との間に9塩基スペーサーが存在するオリゴマープライマー（配列番号12）を用いると結合した12量体オリゴヌクレオチドが特異的に3塩基延長するのが認められた。図19に示すように、S1A8部分とDNA二重らせんととのDNAスペーサー長さが0、3、6及び12の場合にも同様の結果が認められた。ウェハのMALDI-TOF質量分析の結果を図20に示す。更に、図19は、エクステンション反応を各種ポリメラーゼを用いて実施し得ることを示す。従って、S1A8リンカーはDNA鎖型に直接

フェニル)-1-0-(2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタン

A. 2-ニトロ-5-(3-ヒドロキシプロポキシ)ベンズアルデヒド

3-プロモ-1-プロパノール（3.34g、24mmol）を無水アセトニトリル中で5-ヒドロキシ-2-ニトロベンズアルデヒド（3.34g、20mmol）、K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>（3.5g）及びKI（100mg）と一緒に（15時間）還流した。反応混合物を室温に冷却し、ジクロロメタン150mlを添加した。混合物を濾過し、固体残渣をジクロロメタンで洗浄した。合わせた有機溶液を蒸発乾燥し、ジクロロメタン100ml中に再溶解した。生じた溶液を飽和NaCl溶液で洗浄し、硫酸

ナトリウムで乾燥した。溶媒を真空中で除去後、所望の生成物4.31g（96%）が得られた。

R<sub>f</sub>=0.33（ジクロロメタン/メタノール=95/5）

UV（メタノール）：最大313、240（肩）、215nm、最小266nm  
<sup>1</sup>H NMR（DMSO-d<sub>6</sub>）δ 10.28（s, 1H）、8.17（d, 1H）、7.35（d, 1H）、7.22（s, 1H）、4.22（t, 2H）、3.54（t, 2H）、1.90（m, 2H）

<sup>13</sup>C NMR（DMSO-d<sub>6</sub>）δ 189.9、153.0、141.6、134.3、127.3、118.4、114.0、66.2、56.9、31.7

B. 2-ニトロ-5-(3-オ-4,4'-ジメチルシリルプロポキシ)ベンズアルデヒド

2-ニトロ-5-(3-ヒドロキシプロポキシ)ベンズアルデヒド（1g、4.44mmol）を無水アセトニトリル50mlに溶解した。この溶液に、トリエチルアミン1ml、イミダゾール200mg及びtBDMSCl0.8g（5.3mmol）を添加した。混合物を室温で4時間攪拌した。反応を止

めるためにメタノール1mlを添加した。溶媒を真空中で除去し、固体残渣をジ

クロロメタン100mlに再溶解した。生じた溶液を飽和重炭酸ナトリウム溶液、次いで水で洗浄した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を真空下で除去した。粗混合物をクイックシリカゲルカラムにかけ、ジクロロメタンで溶出すると、2-ニトロ-5-(3-O-*t*-ブチルジメチルシリルプロポキシ)ベンズアルデヒド1.44g(96%)が得られた。

$R_f=0.67$  (ヘキサン/酢酸エチル=5/1)

UV (メタノール): 最大317, 243, 215nm、最小235, 267nm

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  10.28 (s, 1H)、8.14 (d, 1H)、7.32 (d, 1H)、7.20 (s, 1H)、4.20 (t, 2H)、3.75 (t, 2H)、1.90 (m, 2H)、0.85 (s, 9H)、0.02 (s, 6H)

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  189.6、162.7、141.5、134.0、127.1、118.2、113.8、65.4、58.5、31.2、25.5、-3.1、-

5.7

C. 1-(2-ニトロ-5-(3-O-*t*-ブチルジメチルシリルプロポキシ)フェニル)エタノール

高真空乾燥した2-ニトロ-5-(3-O-*t*-ブチルジメチルシリルプロポキシ)ベンズアルデヒド(1.02g, 3mmol)を無水ジクロロメタン50mlに溶解した。トルエン(3ml)中2Mトリメチルアルミニウムを10分間を要して滴下し、反応混合物を室温で保持した。更に10分間攪拌し、混合物を氷冷水10mlに注いだ。乳濁液を水相から分離し、硫酸ナトリウム100gで乾燥して残存する水を除去した。溶媒を真空下で除去し、混合物をシリカゲルカラムにかけ、ジクロロメタン/メタノールで勾配溶離した。所望の生成物0.94g(86%)が単離された。

$R_f=0.375$  (ヘキサン/酢酸エチル=5/1)

UV (メタノール): 最大306, 233, 206nm、最小255, 220nm

E. 1-(2-ニトロ-5-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)フェニル)エタノール

1-(2-ニトロ-5-(3-ヒドロキシプロポキシ)フェニル)エタノール(0.482g, 2mmol)を無水ピリジンと2回共蒸発させ、無水ピリジン20mlに溶解した。溶液を氷水浴で冷却し、DMTC1750mg(2.2mmol)を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌し、反応を止めるためにメタノール0.5mlを添加した。溶媒を真空下で除去し、残渣をトルエンと2回共蒸発させて痕跡量のピリジンを除去した。最終残渣をシリカゲルカラムにかけ、トリエチルアミンを数滴含むジクロロメタン/メタノールで勾配溶離した。所望の

生成物である1-(2-ニトロ-5-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)フェニル)エタノール0.96g(89%)が得られた。

$R_f=0.50$  (ジクロロメタン/メタノール=99/1)

UV (メタノール): 最大350(肩)、305, 283, 276(肩)、233, 208nm、最小290, 258, 220nm

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.00 (d, 1H)、6.82-7.42 (ArH)、5.52 (d, OH)、5.32 (m, 1H)、4.23 (t, 2H)、3.71 (s, 6H)、3.17 (t, 2H)、2.00 (m, 2H)、1.37 (d, 3H)

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.5、157.9、157.7、146.1、144.9、140.1、139.7、135.7、129.5、128.8、127.6、127.5、127.3、126.9、126.4、113.0、112.8、112.6、85.2、65.3、63.9、59.0、54.8、28.9、24.9

F. 1-(2-ニトロ-5-(3-O-4, 4'-ジメトキシ

トリチルプロポキシ)フェニル)-1-O-(2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタン

m

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.00 (d, 1H)、7.36 (s, 1H)、7.00 (d, 1H)、5.49 (b, OH)、5.31 (q, 1H)、4.19 (m, 2H)、3.7

7 (t, 2H)、1.95 (m, 2H)、1.37 (d, 3H)、0.86 (s, 6H)、0.04 (s, 6H)

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.6、146.2、139.6、126.9、112.9、112.5、64.8、63.9、58.7、31.5、25.6、24.9、-3.4、-5.8

D. 1-(2-ニトロ-5-(3-ヒドロキシプロポキシ)フェニル)エタノール

1-(2-ニトロ-5-(3-O-*t*-ブチルジメチルシリルプロポキシ)フェニル)エタノール(0.89g, 2.5mmol)をTHF30mlに溶解し、 $n\text{Bu}_4\text{NF}$ 0.5mmolを攪拌しながら添加した。混合物を室温で5時間攪拌し、溶媒を真空下で除去した。残渣をシリカゲルカラムにかけ、ジクロロメタン/メタノールで勾配溶離した。1-(2-ニトロ-5-(3-ヒドロキシプロポキシ)フェニル)エタノール0.6g(99%)が得られた。

$R_f=0.17$  (ジクロロメタン/メタノール=95/5)

UV (メタノール): 最大304, 232, 210nm、最小255, 219nm

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  8.00 (d, 1H)、7.33 (s, 1H)、7.00 (d, 1H)、5.50 (d, OH)、5.28 (t, OH)、4.59 (t, 1H)、4.17 (t, 2H)、3.57 (m, 2H)、1.89 (m, 2H)、1.36 (d, 2H)

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  162.8、146.3、139.7、127.1、113.1、112.6、65.5、64.0、57.0、31.8、25.0

1-(2-ニトロ-5-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)フェニル)エタノール(400mg, 0.74mmol)を高真空下で乾燥し、無水ジクロロメタン20mlに溶解した。この溶液に、N, N-ジイソプロピルエチルアミン0.5ml及び2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルクロホスホルアミダイト0.3ml(1.34mmol)を添加した。反応混合物を室温で30分間攪拌し、反応を止めるためにメタノール0.5mlを添加した。混合物を飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を真空下で除去し、クイックシリカゲルカラムにかけ、トリエチルアミンを数滴含むジクロロメタン/メタノールで溶離した。所望のホスホルアミダイト510mg(93%)が得られた。

$R_f=0.87$  (ジクロロメタン/メタノール=99/1)

#### 実施例10

1-(4-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)-1-O-(2

-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタン

A. 4-(3-ヒドロキシプロポキシ)-3-メトキシアセトフェノン

3-ブローモ-1-プロパノール(53ml, 33mmol)を無水アセトニトリル100ml中で4-ヒドロキシ-3-メトキシアセトフェノン(5g, 30mmol)、 $\text{K}_2\text{CO}_3$ (5g)及びKI(300mg)と一緒に15時間還流した。室温に冷却後ジクロロメタン(150ml)を反応混合物に添加した。混合物を濾過し、固体残渣をジクロロメタンで洗浄した。合わせた有機溶液を蒸発乾固し、ジクロロメタン100mlに再溶解した。生じた溶液を飽和NaCl溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を真空下で除去後所望生成物6.5g(96.4%)が得られた。

$R_f=0.41$  (ジクロロメタン/メタノール=95/5)

UV (メタノール): 最大304, 273, 227, 210nm、最小291, 244, 214nm

$^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.64 (d, 1H)、7.46 (s, 1H)

), 7.04 (d, 1H), 4.58 (b, O

H), 4.12 (t, 2H), 3.80 (s, 3H), 3.56 (t, 2H), 2.54 (s, 3H), 1.88 (m, 2H)

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 196.3, 152.5, 148.6, 129.7, 123.1, 111.5, 110.3, 65.4, 57.2, 55.5, 31.9, 26.3

B. 4- (3-アセトキシプロポキシ) -3-メトキシアセトフェノン

4- (3-ヒドロキシプロポキシ) -3-メトキシアセトフェノン (3.5 g, 15.6 mmol) を乾燥し、無水アセトニトリル80 mlに溶解した。この混合物にトリエチルアミン6 ml及び無水酢酸6 mlを添加した。4時間後、メタノール6 mlを添加し、溶媒を真空下で除去した。残渣をジクロロメタン100 mlに溶解し、溶液を希重炭酸ナトリウム溶液、次いで水で洗浄した。有機相を硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を除去した。固体残渣をシリカゲルカラムにかけ、ジクロロメタンで溶離すると、4- (3-アセトキシプロポキシ) -3-メトキシアセトフェノン4.1 g (98.6%) が得られた。

R<sub>f</sub>=0.22 (ジクロロメタン/メタノール=99/1)

UV (メタノール): 最大303, 273, 227, 210 nm

m, 最小290, 243, 214 nm

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.62 (d, 1H), 7.45 (s, 1H), 7.08 (d, 1H), 4.42 (m, 4H), 3.82 (s, 3H), 2.54 (s, 3H), 2.04 (m, 2H), 2.00 (s, 3H)

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 196.3, 170.4, 152.2, 148.6, 130.0, 123.0, 111.8, 110.4, 65.2, 60.8, 55.5, 27.9, 26.3, 20.7

C. 4- (3-アセトキシプロポキシ) -3-メトキシ-6-ニトロアセトフェノン

4- (3-アセトキシプロポキシ) -3-メトキシアセトフェノン (3.99

4.28 (t, 2H), 4.20 (t, 2H), 3.96 (s, 3H), 2.48 (s, 3H), 2.20 (m, 2H), 2.08 (s, 3H)

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 200.0, 171.0, 154.3, 148.8, 138.3, 133.0, 108.8, 108.0, 66.1, 60.8, 56.6, 30.4, 28.2, 20.9

D. 1- (4- (3-ヒドロキシプロポキシ) -3-メトキシ-6-ニトロフェニル) エタノール

4- (3-アセトキシプロポキシ) -3-メトキシ-6-ニトロアセトフェノン (3.73 g, 12 mmol) にエタノール150 ml及びK<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>6.5 gを添加した。混合物を室温で4時間攪拌した。ジクロロメタン中5%メタノールを用いるTLCは反応の完了を示した。この同じ反応混合物にNaBH<sub>4</sub>3.5 gを添加し、混合物を室温で2時間攪拌した。アセトン

10 mlを添加して残りのNaBH<sub>4</sub>と反応させた。溶媒を真空下で除去し、残渣をシリカゲル50 gに吸収させた。このシリカゲル混合物をシリカゲルカラムの上部にかけ、ジクロロメタン中5%メタノールで溶離して、所望生成物の1- (4- (3-ヒドロキシプロポキシ) -3-メトキシ-6-ニトロフェニル) エタノール3.15 g (97%) が得られた。脱保護後の中間生成物の4- (3-ヒドロキシプロポキシ) -3-メトキシ-6-ニトロアセトフェノン:

R<sub>f</sub>=0.60 (ジクロロメタン/メタノール=95/5)

最終生成物の1- (4- (3-ヒドロキシプロポキシ) -3-メトキシ-6-ニトロフェニル) エタノール:

R<sub>f</sub>=0.50 (ジクロロメタン/メタノール=95/5) UV (メタノール)

: 最大344, 300, 243, 219 nm, 最小317, 264, 233 nm  
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.54 (s, 1H), 7.36 (s, 1H), 5.47 (d, OH), 5.27 (m, 1H), 4.55 (t, OH), 4.05 (t, 2H), 3.90 (s, 3H), 3.55 (q, 2H), 1.88 (m, 2H), 1.37 (d, 3H)

g, 15 mmol) を水浴にて70%-HNO<sub>3</sub>15 mlに少しずつ添加し、反応温度を室温に維持した。反応混合物を室温で30分間攪拌し、砕いた氷30 gを添加した。この混合物をジクロロメタン100 mlに抽出し、有機相を飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄した。溶液を硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を真空下で除去した。粗混合物をシリカゲルカラムにかけ、ジクロロメタン中メタノールで勾配溶離すると、所

望生成物の4- (3-アセトキシプロポキシ) -3-メトキシ-6-ニトロアセトフェノン3.8 g (81.5%) 及びipso置換生成物である5- (3-アセトキシプロポキシ) -4-メトキシ-1, 2-ジニトロベンゼン0.38 g (8%) が得られた。

ipso置換副生成物5- (3-アセトキシプロポキシ) -4-メトキシ-1, 2-ジニトロベンゼン:

R<sub>f</sub>=0.47 (ジクロロメタン/メタノール=99/1)

UV (メタノール): 最大334, 330, 270, 240, 212 nm, 最小310, 282, 263, 223 nm

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.36 (s, 1H), 7.34 (s, 1H), 4.28 (t, 2H), 4.18 (t, 2H), 4.02 (s, 3H), 2.20 (m, 2H), 2.08 (s, 3H)

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 170.9, 152.2, 151.1, 117.6, 111.2, 107.9, 107.1, 66.7, 60.6, 56.9, 28.2, 20.9

所望生成物4- (3-アセトキシプロポキシ) -3-メトキシ-6-ニトロアセトフェノン:

R<sub>f</sub>=0.29 (ジクロロメタン/メタノール=99/1)

UV (メタノール): 最大344, 300, 246, 213 nm, 最小320, 270, 227 nm

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 7.62 (s, 1H), 6.74 (s, 1H),

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 153.4, 146.4, 138.8, 137.9, 109.0, 108.1, 68.5, 65.9, 57.2, 56.0, 31.9, 29.6

E. 1- (4- (3-オ-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ) -3-メトキシ-6-ニトロフェニル) エタノール

1- (4- (3-ヒドロキシプロポキシ) -3-メトキシ-6-ニトロフェニル) エタノール (0.325 g, 1.2 mmol) を無水ピリジンと2回共蒸発し、無水ピリジン15 mlに溶解した。溶液を氷水浴で冷却し、DMTC1450 mg (1.33 mmol) を添加した。反応混合物を室温で一晩攪拌し、反応を止めるためにメタノール0.5 mlを添加した。溶媒を真空下で除去し、残渣をトルエンと2回共蒸発させて痕跡量のピリジンを除去した。最終残渣をシリカゲルカラムにかけ、トリエチルアミンを数滴含むジクロロメタン中メタノールで勾配溶離して、所望生成物の1- (4- (3-オ-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ) -3-メトキシ-6-ニトロフェニル) エタノール605 mg (88%) が得られた。

R<sub>f</sub>=0.50 (ジクロロメタン/メタノール=95/5)

UV (メタノール): 最大354, 302, 282, 274,

233, 209 nm, 最小322, 292, 263, 222 nm

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 7.54 (s, 1H), 6.8-7.4 (ArH), 5.48 (d, OH), 5.27 (m, 1H), 4.16 (t, 2H), 3.85 (s, 3H), 3.72 (s, 6H), 3.15 (t, 2H), 1.98 (t, 2H), 1.37 (d, 3H)

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>) δ 157.8, 153.3, 146.1, 144.9, 138.7, 137.8, 135.7, 129.4, 128.7, 127.5, 127.4, 126.3, 112.9, 112.6, 108.9, 108.2, 85.1, 65.7, 63.7, 59.2, 55.8, 54.8, 29.0, 25.0

F. 1- (4- (3-オ-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ) -3-メト

キシ-6-ニトロフェニル)-1-O-((2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタン

1-(4-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)エタノール (2)

0.0 mg, 3.5 mmol)を高真空下で乾燥し、無水ジクロロエタン15 mlに溶解した。この溶液にN, N-ジイソプロピルエチルアミン0.5 ml及び2-シアノエチル-N, N-ジイソプロピルクロロホスホルアミダイト0.2 ml (0.89 mmol)を添加した。反応混合物を室温で30分間攪拌し、反応を止めるためにメタノール0.5 mlを添加した。混合物を飽和重炭酸ナトリウム溶液で洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を真空下で除去し、クイックシリカゲルカラムにかけ、トリエチルアミンを数滴含むジクロロメタン中1%メタノールで溶離して、所望ホスホルアミダイトの1-(4-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)-1-O-((2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタン247 mg (91.3%)が得られた。

R<sub>f</sub>=0.87 (ジクロロメタン/メタノール=99/1)

#### 実施例11

オリゴヌクレオチド合成

光開裂性リンカーを含むオリゴヌクレオチド結合体を標準条件下で固相核酸合成 (Sinhaら, Tetrahedron

Lett., 24, 5843-5846 (1983); Sinhaら, Nucleic Acids Res., 12, 4539-4557 (1984); Beauchageら, Tetrahedron, 49, 6123-6194 (1993); 及び Matteucciら, J. Am. Chem. Soc., 103, 3185-3191 (1981) 参照)により製造した。また、光開裂性単位及び5'末端アミノ基を導入するために長いカップリング時間を使用した。カップリング効率を遊離DMTカチオンの吸光度を測定することにより調べ、その結

果はホスホルアミダイトの1-(2-ニトロ-5-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)フェニル)-1-O-((2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタンまたは1-(4-(3-O-4, 4'-ジメトキシトリチルプロポキシ)-3-メトキシ-6-ニトロフェニル)-1-O-((2-シアノエトキシ)-ジイソプロピルアミノホスフィノ)エタンのカップリング効率は従来のヌクレオシドホスホルアミダイトに匹敵することを示した。濃アンモニウムを用いて55℃で一晩処理して塩基保護を脱保護し、固体支持体から結合体を遊離した。他の結合体の塩基保護は、AMA試薬を

用いて迅速に脱保護した。結合体上MMTの精製は、0.1M酢酸トリエチルアンモニウム (pH 7.0)を用い、アセトニトリル (20分で5%→25%)の勾配を用いてHPLC (トリチル-オン)で実施した。集めたMMTまたはDMT保護結合体の容量を減らし、80%酢酸水溶液を用いて脱トリチル化し (40分、0℃)、脱塩し、-20℃で保存した。

#### 実施例12

光分解研究

通常、200 μlの蒸留水中の光開裂性リンカー含有オリゴヌクレオチド2 nmolを、10 cmの距離から長波長UVランプ (Black Ray XX-15 UVランプ、カリフォルニア州サンガブリエルに所在のUltravioletの製品)で照射した (励起ピーク365 nm、距離31 cmでのランプ照射の強さ=1.1 mW/cm<sup>2</sup>)。生じた混合物を、0.1M酢酸トリエチルアンモニウム (pH 7.0)及びアセトニトリル勾配を用いてHPLC (トリチル-オフ)で分析した。分析は、結合体はUV照射で数分以内にリンカーから開裂されることを示した。

均等物

当業者ならば、本明細書に記載した特定の方法に対する多数の均等物を通常の実験により想到し得、または確認することができる。前記均等物も本発明の範囲内であると見做され、下記する請求の範囲により包含される。

#### 配列表

配列番号: 1

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 不明

配列の種類: cDNA

ハイボセティカル: No

アンチセンス: No

フラグメント型:

起源:

配列

GAATTCGAGC TCGGTACCCG G

21

配列番号: 2

配列の長さ: 21

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 不明

配列の種類: cDNA

ハイボセティカル: No

アンチセンス: No

フラグメント型:

起源:

配列

CCGGTACCG AGCTCGAATT C

21

配列番号: 3

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

鎖の数: 不明

トポロジー: 不明

配列の種類: cDNA

ハイボセティカル: No

アンチセンス: No

フラグメント型:

起源:

配列

CCCTTGGA ACTGTAGT ATT

21

配列番号: 4

配列の長さ: 112

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 不明

配列の種類: cDNA

ハイボセティカル: No

アンチセンス: No

フラグメント型:

起源:

配列

AGGCTGTCTC TCTCCCTCTC TCATACAC ACACACAC ACACACAC ACACACAC  
60  
ACACACAC TCACACTCAC CCACANNHAA ATACTACACA GTTCCCAAGA GG  
112

配列番号: 5

配列の長さ: 49

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 不明

配列の種類: cDNA

配列番号: 7

配列の長さ: 12

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 不明

配列の種類: cDNA

ハイボセティカル: No

アンチセンス: No

フラグメント型:

起源:

配列

AATACTACAC AG

12

配列番号: 8

配列の長さ: 24

配列の型: 核酸

鎖の数: 不明

トポロジー: 不明

配列の種類: cDNA

ハイボセティカル: No

ハイボセティカル: No

アンチセンス: No

フラグメント型:

起源:

配列

TAATAGACT CACTATAGGG CGAAGGCTGT CTCTCTCCCT CTCTCATAC 49

配列番号: 6

配列の長さ: 135

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 不明

配列の種類: cDNA

ハイボセティカル: No

アンチセンス: No

フラグメント型:

起源:

配列

TAATAGACT CACTATAGGG CGAAGGCTGT CTCTCTCCCT CTCTCATACA CACACACACA  
60  
CACACACACA CACACACACA CACACACACA CACTCAGACT CACCCACANN NAAATACTAC  
120  
ACAGTTCCCA AGAGG  
135

アンチセンス: No

フラグメント型:

起源:

配列

CTGATCCCTC GGATCATCTT TTTT

24

配列番号: 9

配列の長さ: 23

配列の型: 核酸

鎖の数: 一本鎖

トポロジー: 不明

配列の種類: cDNA

ハイボセティカル: No

アンチセンス: No

フラグメント型:

起源:

配列

GATGATCCGA CGCATCAGAA TGT

23

配列番号: 10

配列の長さ: 29

配列の型：核酸

鎖の数：不明

トポロジー：不明

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列

GATCTAGCTG GCGGAGCTA GGCCGTTGA

29

配列番号：11

配列の長さ：27

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

トポロジー：不明

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列

GATGATCCGA CGCAT

15

配列番号：14

配列の長さ：12

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列

起源：

配列

CTGATGCGTC GGATCATCTT TTTTTT

27

配列番号：12

配列の長さ：12

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列

GATGATCCGA CG

12

配列番号：13

配列の長さ：15

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

AAAAAGATG AT

12

配列番号：15

配列の長さ：12

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列

GATCCGACGC AT

12

配列番号：16

配列の長さ：18

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：cDNA



ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列

CTGATGCGTC GGATCATC

16

配列番号：17

配列の長さ：50

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列

GCCTGGTACA CTGCCAGGCA CTCTGCAAG TCATCGCAT CGCGAGGAG 50

配列番号：18

配列の長さ：50

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列

GCCTGGTACA CTGCCAGGCA CTCTGCAAG TCATCGCAT CGCGAGGAG 50

配列番号：19

配列の長さ：21

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：不明

配列の種類：cDNA

ハイボセティカル：No

アンチセンス：No

フラグメント型：

起源：

配列

GATGCGGATG ACCTGCAGAG

21

【図1】

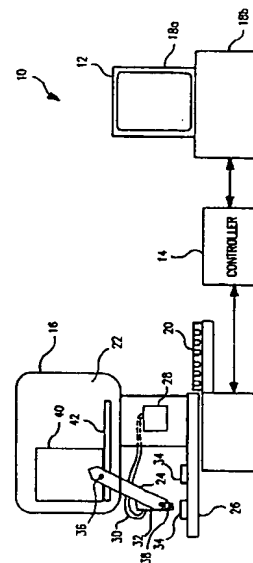


FIG. 1

【図 2】

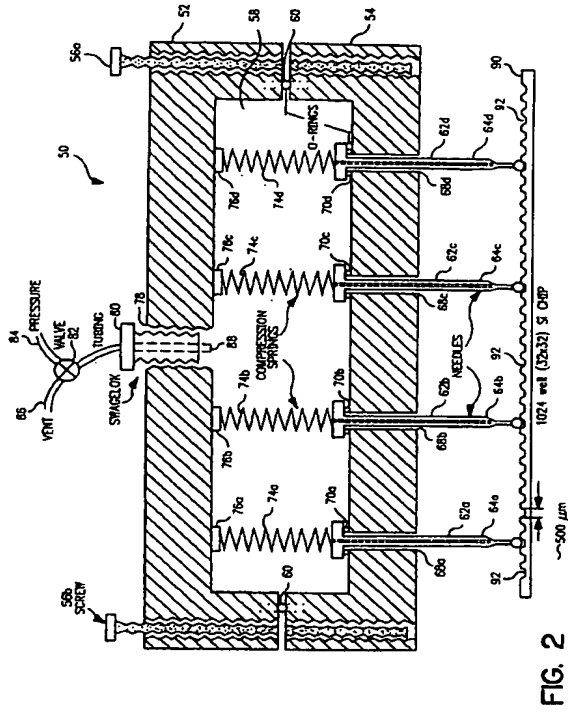


FIG. 2

【図 3】

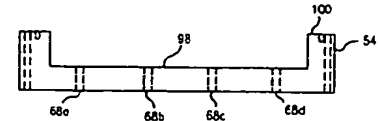


FIG. 3

【図 4】

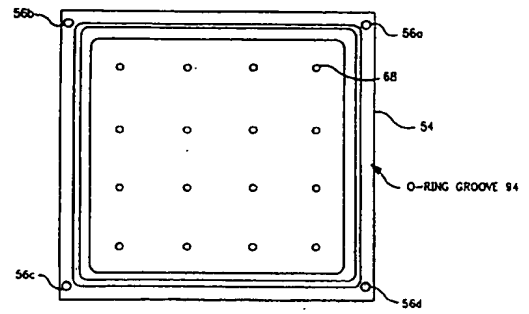


FIG. 4

【図 5】

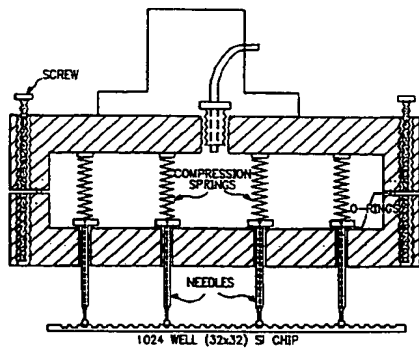


FIG. 5A

【図 5】

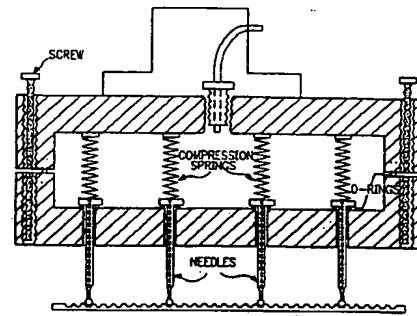


FIG. 5C

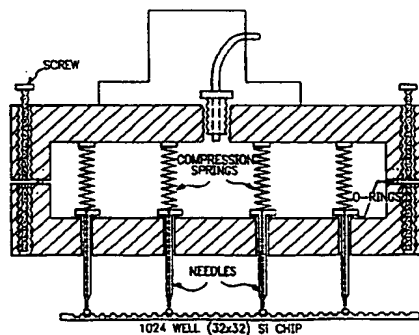


FIG. 5B

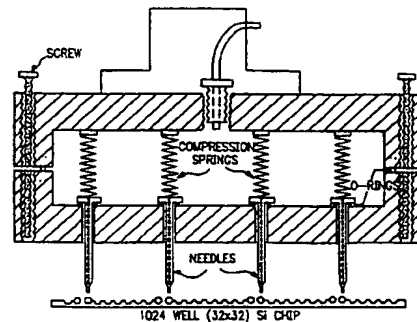


FIG. 5D

【図 6】

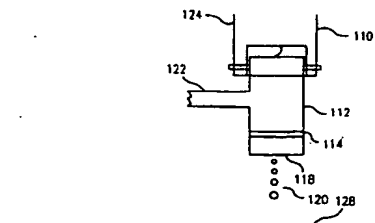


FIG. 6A

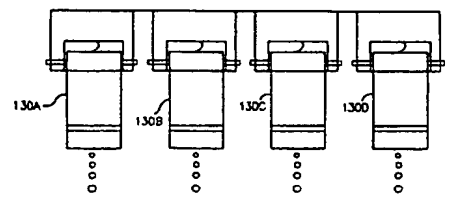


FIG. 6B

【図 7】

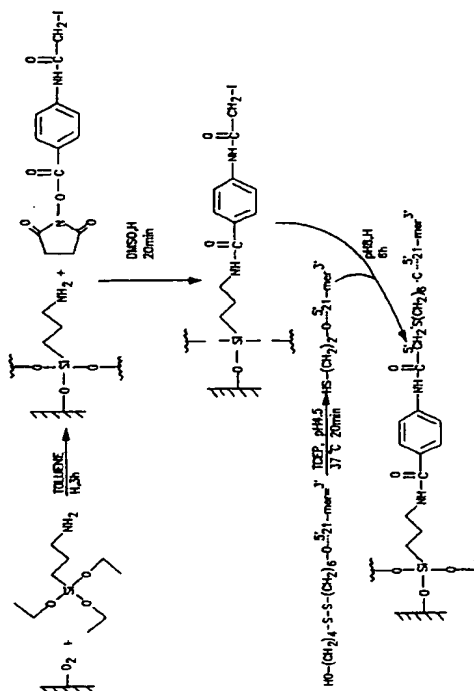


FIG. 7

【図 8】

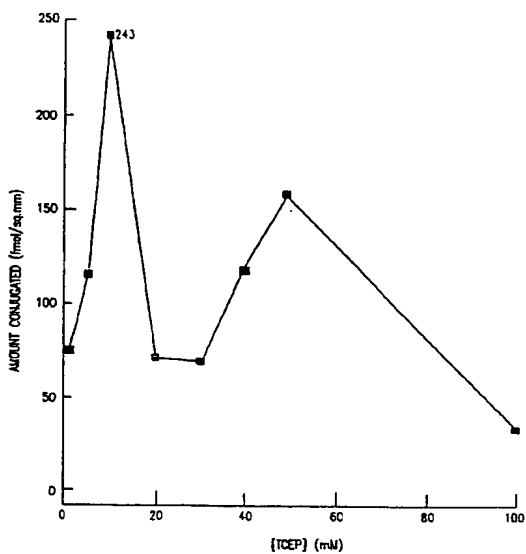


FIG. 8

【図 9】

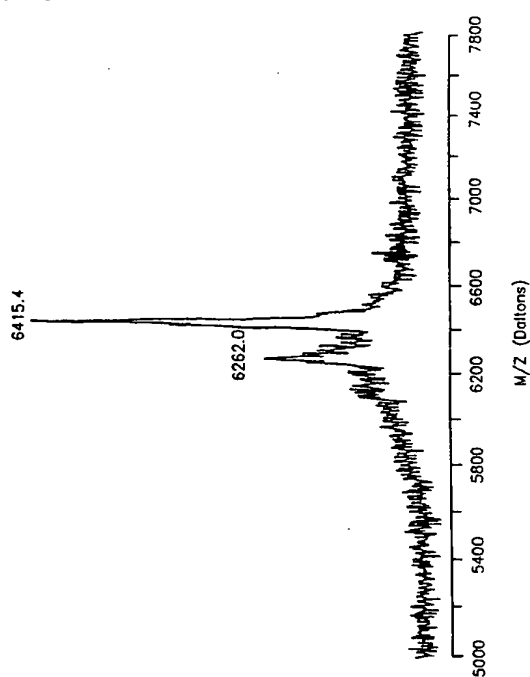


FIG. 9

【図 10】

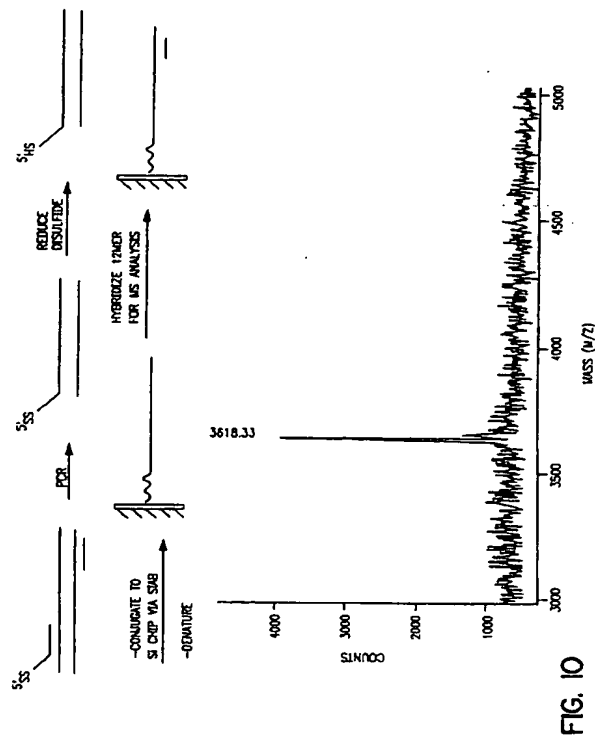


FIG. 10

【図 11】

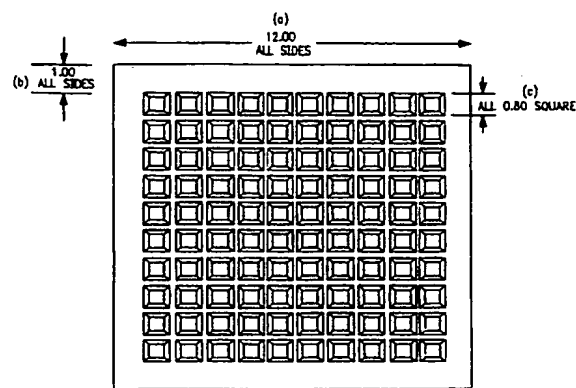


FIG. 11

【図 12】

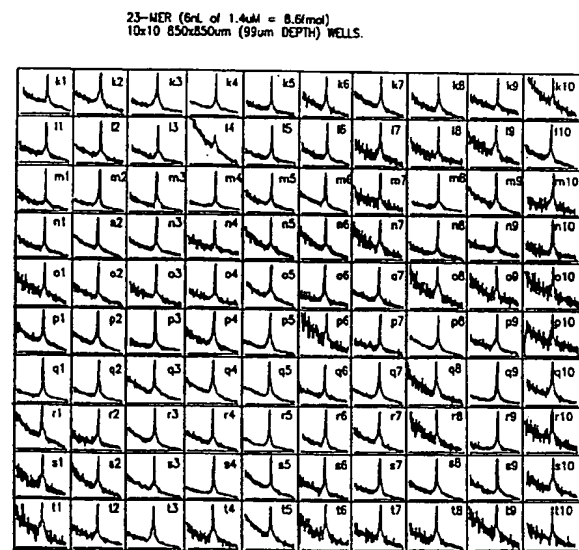


FIG. 12

【図 13】

k1 6968 Da 170 RP	k2 6968 Da 100 RP	k3 6988 Da 90 RP	k4 6977 Da 100 RP	k5 6971 Da 170 RP	k6 6968 Da 110 RP	k7 6972 Da 160 RP	k8 6978 Da 110 RP	k9 6952 Da 250 RP	k10 6965 Da 300 RP
l1 6965 Da 130 RP	l2 6989 Da 140 RP	l3 6982 Da 210 RP	l4 6996 Da 50 RP	l5 6982 Da 160 RP	l6 6968 Da 180 RP	l7 6984 Da 130 RP	l8 6968 Da 200 RP	l9 6996 Da 80 RP	l10 6968 Da 100 RP
m1 6966 Da 180 RP	m2 6979 Da 120 RP	m3 6975 Da 120 RP	m4 6968 Da 190 RP	m5 6976 Da 110 RP	m6 6986 Da 120 RP	m7 6973 Da 160 RP	m8 6978 Da 160 RP	m9 6975 Da 230 RP	m10 6955 Da 250 RP
n1 6961 Da 340 RP	n2 6971 Da 180 RP	n3 6970 Da 150 RP	n4 6960 Da 300 RP	n5 6985 Da 120 RP	n6 6953 Da 210 RP	n7 6971 Da 140 RP	n8 6962 Da 160 RP	n9 6957 Da 150 RP	n10 6960 Da 160 RP
o1 6965 Da 140 RP	o2 6960 Da 230 RP	o3 6976 Da 200 RP	o4 6953 Da 250 RP	o5 6983 Da 110 RP	o6 6967 Da 250 RP	o7 6970 Da 150 RP	o8 6973 Da 70 RP	o9 6953 Da 140 RP	o10 6952 Da 140 RP
p1 6976 Da 140 RP	p2 6981 Da 90 RP	p3 6972 Da 180 RP	p4 6969 Da 90 RP	p5 6984 Da 130 RP	p6 6968 Da 100 RP	p7 6958 Da 290 RP	p8 6981 Da 100 RP	p9 6978 Da 110 RP	p10 6955 Da 150 RP
q1 6976 Da 170 RP	q2 6985 Da 100 RP	q3 6990 Da 120 RP	q4 6989 Da 90 RP	q5 6984 Da 90 RP	q6 6969 Da 170 RP	q7 6979 Da 70 RP	q8 6968 Da 140 RP	q9 6973 Da 120 RP	q10 6950 Da 120 RP
r1 6966 Da 130 RP	r2 6960 Da 150 RP	r3 6969 Da 100 RP	r4 6964 Da 180 RP	r5 6966 Da 130 RP	r6 6970 Da 110 RP	r7 6972 Da 90 RP	r8 6939 Da 130 RP	r9 6951 Da 230 RP	r10 6965 Da 200 RP
s1 6963 Da 130 RP	s2 6953 Da 210 RP	s3 6970 Da 120 RP	s4 6971 Da 170 RP	s5 6957 Da 130 RP	s6 6956 Da 160 RP	s7 6966 Da 140 RP	s8 6975 Da 120 RP	s9 6951 Da 230 RP	s10 6969 Da 120 RP
t1 6974 Da 90 RP	t2 6958 Da 160 RP	t3 6959 Da 120 RP	t4 6952 Da 100 RP	t5 6959 Da 110 RP	t6 6954 Da 100 RP	t7 6950 Da 180 RP	t8 6974 Da 140 RP	t9 6967 Da 150 RP	t10 6950 Da 230 RP

LASER POWER = 41000 FOR ALL SPECTRA.  
EACH SPECTRUM THE SUM OF 10-30 SINGLE SHOTS.

FIG. 13

【図 14】

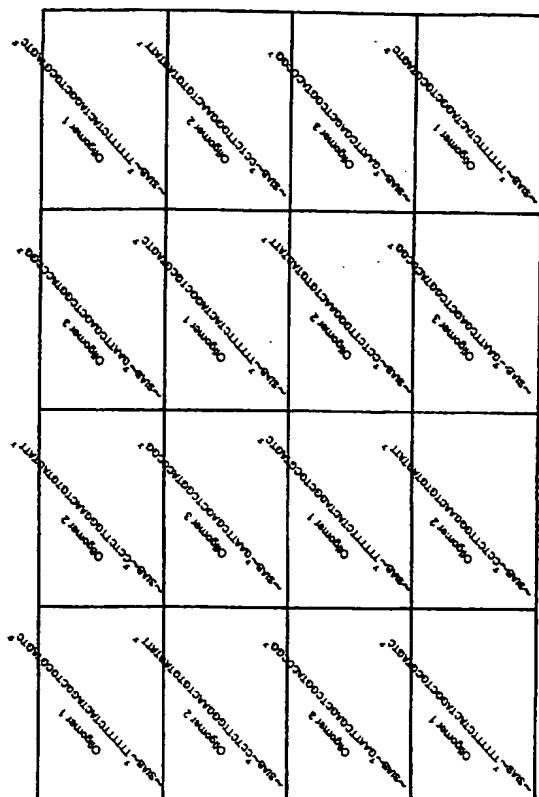


FIG. 14

【図 15】

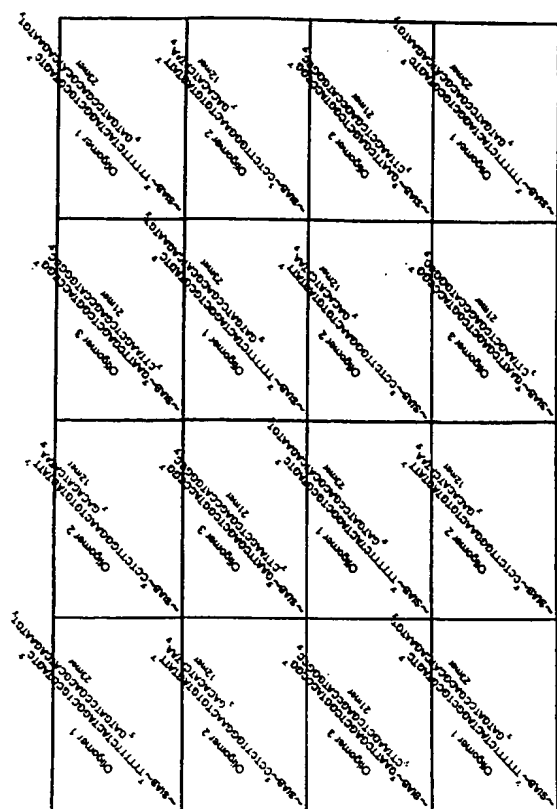


FIG. 15

【図 16】

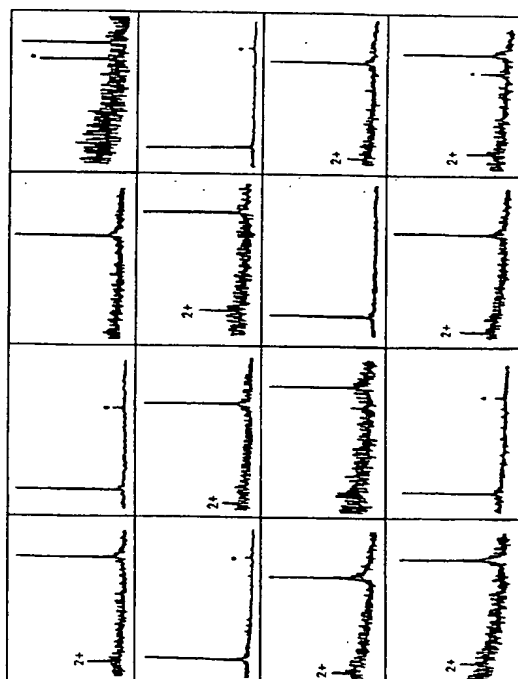


FIG. 16

【図 17】

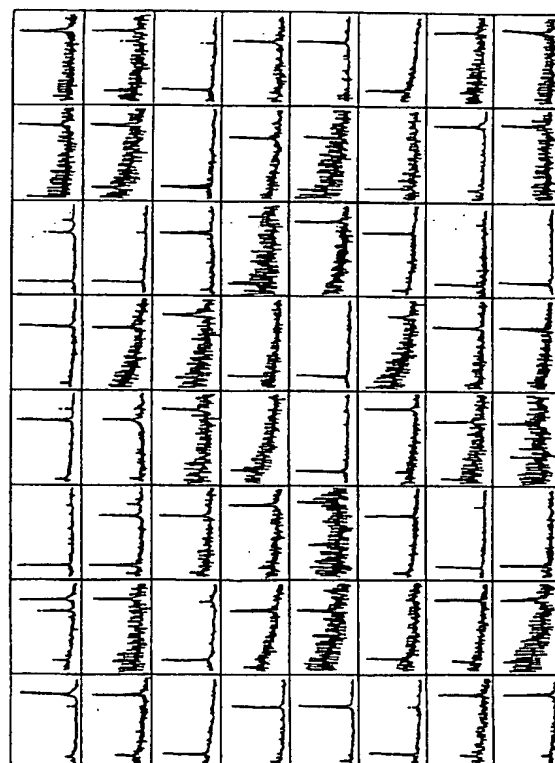


FIG. 17

【図18】

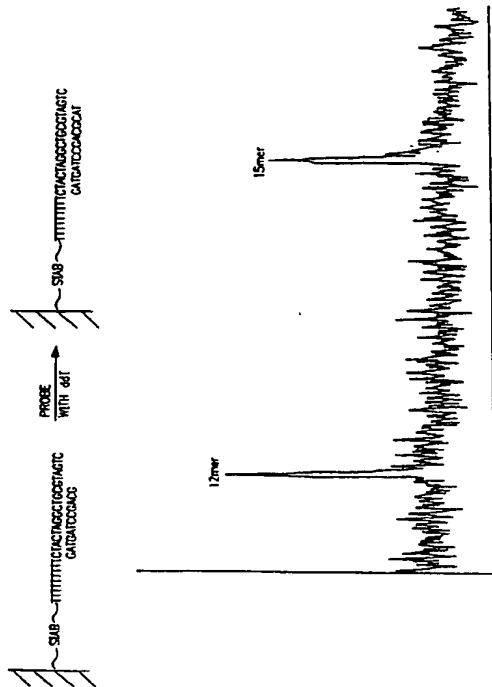


FIG. 18

【図19】

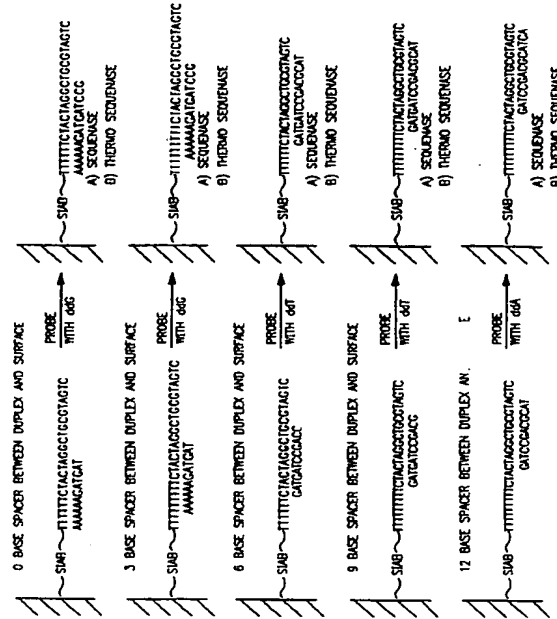


FIG. 19

【図20】

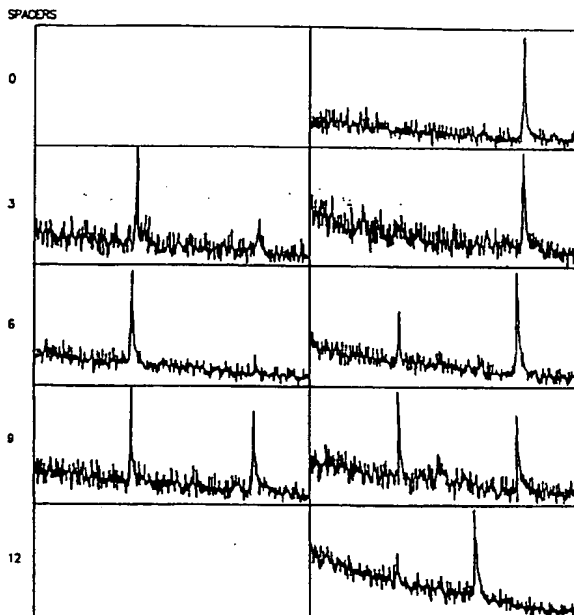


FIG. 20

【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】平成11年3月10日（1999. 3. 10）

【補正内容】

請求の範囲

1. サブストレート表面に対して化学的または生物学的手法でナノリッター容量の流体を分配するための分配装置であって、

複数の側面と複数の孔が形成されてなる底部部分とを有し、前記側面と前記底部部分により内部が規定されているハウジング、

前記孔内に取り付けられており、ナノリッター容量の流体を保持・分配するために同じ大きさの流体保持チャンバを有している1つ以上の流体通過ベシクルであって、前記流体保持チャンバが前記ハウジング内部と流体連通して配置されている前記流体通過ベシクル、及び

前記ベシクルの流体保持チャンバが十分に充填されたときにナノリッター容量の大きさの流体通過ベシクルからナノリッター容量の流体を選択的に分配するために前記ハウジング内部と連通している分配手段

を含み、前記装置がサブストレート表面上に位置合わせして配置されたときに前記分配手段がサブストレート表面に対してナノリッター容量の流体を分配することを特徴とする前記分配装置。

置。

2. 前記した各流体通過ベシクルは近位開放端部と前記孔内に取り付けられたときに前記ハウジングの底部部分を越えて延びている遠位チップ部分とを有し、前記近位開放端部は孔内に取り付けられたときにハウジング内部と流体連通して前記流体保持チャンバを配置していることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

3. 前記した1つ以上の流体通過ベシクルが前記ハウジングの孔内に取外し自在且つ取替え自在に取り付けられていることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

4. 前記した1つ以上の流体通過ベシクルが前記ハウジング内に孔を固定的に

取り付けるためのグルーシールを含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

5. 前記流体保持チャンバが、毛管作用により流体を満たすために十分に狭い径を含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

6. 前記した1つ以上の流体通過ベシクルの各流体保持チャンバが、該流体保持チャンバが毛管作用により流体で実質的に満たされる大きさを有していることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

1項に記載の装置。

7. 前記した複数の流体通過ベシクルが流体送達ニードルのアレーからなることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

8. 前記流体送達ニードルが金属から製造されていることを特徴とする請求の範囲第7項に記載の装置。

9. 前記流体送達ニードルがガラスから製造されていることを特徴とする請求の範囲第7項に記載の装置。

10. 前記流体送達ニードルがシリカから製造されていることを特徴とする請求の範囲第7項に記載の装置。

11. 前記流体送達ニードルがポリマー材料から製造されていることを特徴とする請求の範囲第7項に記載の装置。

12. 前記流体通過ベシクルの数がマルチウエルサブストレートのウェルの数に等しいかもしくはそれより少ないことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

13. 複数の流体通過ベシクルを含み、更に該複数の流体通過ベシクルを機械的に偏移させて前記ハウジング底部部分とシール接触させる機械的偏移手段をも含み、前記ハウジングが更に頂部部分を含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

装置。

14. 前記した各流体通過ベシクルがフランジを含む近位端部分を含み、更に

部を有し、前記ベシクルの流体保持チャンバが該近位開放端部でメニスカスを形成することなく前記流体保持チャンバが毛管作用により流体で実質的に満たされる大きさ

を有していることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

22. 前記分配手段が各ベシクルの流体保持チャンバから分配される流体の量を選択的に変化するための流体選択手段を含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

23. 複数のベシクルを含み、その第1部分は第1の大きさの流体保持チャンバを含み、第2部分は第2の大きさの流体保持チャンバを含み、これにより複数の流体容量が分配されることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

24. 前記流体選択手段が、特定圧力条件下で前記ハウジング内部を処置するために前記ハウジングに連結し前記ハウジング内部と連通している圧力源、及び前記圧力源に連結した、前記した各流体通過ベシクルから分配される流体の量を変化させるべく該流体通過ベシクルの流体チャンバに正圧を加えるために前記ハウジング内部の圧力を変化させる調節手段を含むことを特徴とする請求の範囲第22項に記載の装置。

25. マルチウエルサブストレートの1つ以上のウェルに対して化学的または生物学的手法でナノリッター容量の流体を分配するための流体分配装置であって、

複数の側面と複数の孔が形成されてなる底部部分とを有し、前記側面と前記底部部分により内部が規定されているハウジング、

前記孔内に取り付けられている、前記ハウジングの内部に連通して配置された流体保持チャンバを有するナノリッター容量の流体を保持するための複数の流体通過ベシクル、及び

前記ハウジング内部と連通している、1組の複数の流体通過ベシクルから分配されるべく前記ベシクルの流体保持チャンバに充填される流体の量を自由に選択するための流体容量選択・分配手段

にハウジング内部と外部環境との間にシールを形成するために前記フランジと前記ハウジング底部の内表面との間に配置されるシーラー要素を含むことを特徴とする請求の範囲第13項に記載の装置。

15. 前記機械的偏移手段が複数のスプリング要素を含み、前記した各スプリング要素の一端は前記した各流体通過ベシクルの近位端部に、他端は前記ハウジング頂部部分に連結しており、前記スプリング要素はシールを形成するために前記ベシクルの近位端部に機械的偏移力を加えることを特徴とする請求の範囲第14項に記載の装置。

16. 前記ハウジングが更に頂部部分を含み、更に前記ハウジング頂部部分をハウジング底部部分に固定するための固定手段を含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

17. 前記固定手段が、前記ハウジングの頂部部分及び底部部分の1つに形成された複数のファスナ受容孔と前記ハウジングの頂部部分及び底部部分を一緒に固定するために前記孔内に取り付けるための複数のファスナとを含むことを特徴とする請求の範囲第16項に記載の装置。

請求の範囲第16項に記載の装置。

18. 前記分配手段が、特定圧力条件下で前記ハウジング内部を処置するために前記ハウジング内部に流動的に連結した圧力源を含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

19. 前記流体通過ベシクルが毛管作用により満たされ、前記分配手段が更に異なる圧力条件下でハウジング内部を処置するために圧力源を変更する手段を含み、この圧力源変更手段が各ベシクルの流体保持チャンバを所定流量に相当する所定高さまで満たすために毛管作用を補償するに十分な特定圧力条件下でハウジング内部を処置することを特徴とする請求の範囲第18項に記載の装置。

20. 前記圧力源変更手段が更に特定ナノリッター容量の流体を前記した各ベシクルのチャンバから選択的に排出させるための流体選択手段を含むことを特徴とする請求の範囲第19項に記載の装置。

21. 前記流体通過ベシクルが前記ハウジングの内部に対して開放した近位端

を含み、前記装置がサブストレート上に位置合わせして配置されたときに前記分配手段がマルチウエルサブストレートのウェルにナノリッター容量である特定量の流体を分配することを特徴とする前記流体分配装置。

26. 前記流体容量選択・分配手段が前記1組のベシクルから分配される流体の量を選択するように適合されることを特徴とする請求の範囲第25項に記載の流体分配装置。

27. 前記流体容量選択・分配手段が特定圧力条件下で前記ハウジング内部を処置するために前記ハウジング内部と流動的

に連結した圧力源を含むことを特徴とする請求の範囲第25項に記載の流体分配装置。

28. 更に、前記流体通過ベシクルから分配される流体の量を選択するためにハウジング内部の圧力を変更する手段を含むことを特徴とする請求の範囲第27項に記載の流体分配装置。

29. 前記流体通過ベシクルが毛管作用により流体で満たされ、更に異なる圧力条件下でハウジング内部を処置するために圧力源を変更する手段を含み、この圧力源変更手段が、各ベシクルの流体保持チャンバを所定流量に相当する所定高さまで満たすために毛管作用を補償するに十分な圧力条件下でハウジング内部を処置することを特徴とする請求の範囲第27項に記載の流体分配装置。

30. 前記流体選択手段が、

特定圧力条件下で前記ハウジング内部を処置するために前記ハウジングに連結し前記ハウジング内部に連通している圧力源、及び

前記圧力源に連結した、前記した各流体通過ベシクルの流体保持チャンバから分配される流体の量を変化させるべく該流体通過ベシクルの流体保持チャンバに正圧を加えるために前記ハ

ウジング内部の圧力を変化させる調節手段を含むことを特徴とする請求の範囲第25項に記載の流体分配装置。

31. マルチウエルサブストレートの1つ以上のウェルに対して化学的または

生物学的手法で流体を分配するための流体分配装置であって、

複数の側面と頂部部分と複数の孔が形成されてなる底部部分とを有し、前記側面、前記頂部部分及び前記底部部分により内部が規定されているハウジング、

前記孔内に取り付けられた、前記ハウジング内部に流体通過して配置されたナノリッター容量の流体を保持するための大きさの流体保持チャンバを有する複数の流体通過ベシクル、及び前記した複数の流体通過ベシクルを機械的に遷移させて前記ハウジング底部部分とシール接触させるための機械的遷移手段を含み、前記孔がナノリッター容量の流体を分配することを特徴とする前記流体分配装置。

32. 前記した各流体通過ベシクルがフランジを含む近位端部分を有し、更に内部と外部環境との間に圧力及び流体シールを形成するために前記フランジと前記ハウジング底部部分の内面との間に配置されるシーラー要素を含むことを特徴とする

請求の範囲第31項に記載の流体分配装置。

33. 前記機械的遷移手段が複数のスプリング要素を含み、前記した各スプリング要素の一端は前記した各流体通過ベシクルの近位端部に、他端は前記ハウジング頂部部分に連結しており、前記スプリング要素は流体及び圧力シールを形成するために前記ベシクルの近位端部に機械的遷移力を加えることを特徴とする請求の範囲第31項に記載の流体分配装置。

34. 更に、前記ハウジング頂部部分をハウジング底部部分に固定するための固定手段を含むことを特徴とする請求の範囲第31項に記載の流体分配装置。

35. 前記固定手段が、前記ハウジングの頂部部分及び底部部分の1つに形成された複数のファスナ受容孔と前記ハウジングの頂部部分及び底部部分を一緒に固定するために前記孔内に取り付けられる複数のファスナとを含むことを特徴とする請求の範囲第34項に記載の流体分配装置。

36. 更に、前記ハウジング内部に連通した、流体を前記流体通過ベシクルの流体保持チャンバに充填したときに前記ベシクルから流体を選択的に分配するための分配手段を含み、前記装置がサブストレート上に位置合わせして配置された

43. 複数の流体通過ベシクルを含むことを特徴とする請求の範囲第1項に記載の装置。

44. 請求の範囲第1項に記載の装置を含むシステムであって、更に前記ハウジングに接続したロボットアームを含み、前記ロボットアームはベシクルをナノリッター容量の流体で充填

すべくベシクルを流体ソースに挿入させるためにハウジングを保持し移動させるためのものであり、前記ベシクルから該ベシクルに近接するサブストレート表面上に流体を分配させるべくベシクルを含むハウジングをサブストレートに近接して配置するためのものであることを特徴とする前記システム。

45. 更に、データを処理し、ロボットアームの動作及び操作を制御するための情報を与えるべくプログラム指示を実行するために中央処理手段を含むことを特徴とする請求の範囲第44項に記載のシステム。

46. 前記サブストレートがサブストレート上に沈着させたサンプルに対して質量分析を実施するためのものであることを特徴とする請求の範囲第44項に記載のシステム。

47. サブストレート表面に対して化学的または生物学的手法でナノリッター容量の流体を分配するシステムであって、

1つ以上の孔及び前記孔内に取り付けられた1つ以上の流体通過ピンを含むピンアセンブリであって、前記ピンが材料の中実軸を含み、ナノリッター容量の流体を捕捉するための一端を有する前記ピンアセンブリ、及び

前記ピンアセンブリと接触してロボットアームを含み、前記

ロボットアームは流体を前記ピンの端部で捕捉すべくピンの端部を流体ソースに挿入するために、またはピン端部上の流体をサブストレート表面と接触させることにより該サブストレート表面上に流体を分配させるべくサブストレート表面に近接してピンアセンブリを配置するためにピンアセンブリを保持・移動させるためのものであることを特徴とする前記システム。

48. 更に、データーを処理し、ロボットアームの動作及び操作を制御するた

と前に

記分配手段が前記マルチウェルサブストレートのウェルに流体を分配することを特徴とする請求の範囲第31項に記載の流体分配装置。

37. 前記分配手段が前記ハウジングの内部に流動的に連通している、特定の圧力条件下で前記ハウジング内部を処置するための圧力源を含むことを特徴とする請求の範囲第36項に記載の流体分配装置。

38. 前記した複数の流体通過ベシクルが前記ハウジングの孔内に取外し自在且つ取替え自在に取り付けられていることを特徴とする請求の範囲第31項に記載の流体分配装置。

39. 前記した複数の流体通過ベシクルが流体送達ニードルのアレーからなることを特徴とする請求の範囲第31項に記載の流体分配装置。

40. 前記流体通過ベシクルが毛管作用により流体で満たされ、前記分配手段が更に異なる圧力条件下でハウジング内部を処置するために圧力源を変更する手段を含み、この圧力源変更手段が、各ベシクルの流体保持チャンバを所定流体量に相当する所定高さまで満たすために毛管作用を補償するに十分な特定圧力条件下でハウジング内部を処置することを特徴とする請求

の範囲第36項に記載の流体分配装置。

41. 前記分配手段が各ベシクルの流体保持チャンバから分配される流体の量を選択的に変化させるための流体選択手段を含むことを特徴とする請求の範囲第36項に記載の流体分配装置。

42. 更に、

特定圧力条件下で前記ハウジング内部を処置するために前記ハウジングに連結し前記ハウジング内部に連通している圧力源、及び

前記圧力源に連結した、前記した各流体通過ベシクルの流体保持チャンバから分配される流体の量を変化させるべく該流体通過ベシクルの流体保持チャンバに正圧を加えるために前記ハウジング内部の圧力を変化させる調節手段を含むことを特徴とする請求の範囲第31項に記載の流体分配装置。

めの情報を与えるべくプログラム指示を実行するために中央処理手段を含むことを特徴とする請求の範囲第47項に記載のシステム。

49. 前記したナノリッター容量の流体を捕捉するためのピンの端部が平坦、星形、凹形、山形中実、山形中空及び片側若しくは両側傾斜からなる群から選択される形状を有することを特徴とする請求の範囲第47項に記載のシステム。

50. 前記ピンアセンブリが複数のピンをアレー状に含むことを特徴とする請求の範囲第47項に記載のシステム。

51. サブストレート表面に対して化学的または生物学的手法でナノリッター容量の流体を分配するシステムであって、

毛細管のオリフィスを介して分配されるある容量の流体を収

容するための毛細管要素と前記毛細管に接触して、該毛細管からナノリッター容量の流体を放出させる毛細管の物理的変形を生じさせるためのトランスデューサ要素とを含むアセンブリ、前記アセンブリを保持し、ナノリッター容量の流体を毛細管から該毛細管に整列するサブストレート表面に分配すべくサブストレート表面に近接するアセンブリを整列させるためのロボットアーム、及び

前記ロボットアームを前記アセンブリに固定するための取り付け手段を含むことを特徴とする前記システム。

52. 更に、データーを処理し、ロボットアームの動作及び操作を制御するための情報を与えるべくプログラム指示を実行するための中央処理手段を含むことを特徴とする請求の範囲第51項に記載のシステム。

53. 前記トランスデューサ要素が圧電、電気、電気制限、磁気制限及び電気機械トランスデューサからなる群から選択されることを特徴とする請求の範囲第51項に記載のシステム。

54. サブストレート表面上にサンプル材料のアレーを形成する方法であって、

前記サンプル材料を含む溶媒からなる流体を収容する内部チ

ャンバを有するベシクルを用意するステップ、



前記表面と前記ベシクルを接触させることなく、前記サブストレート表面上の第1位置に近接させてベシクルを配置するステップ、

前記サブストレート表面の第1位置でナノリッター容量の流体を分配すべく前記流体を前記チャンバから放出させるためにベシクルの内部に機械的圧力を与えるステップ、及び

前記サブストレート表面に近接する1組の位置の各々に前記ベシクルを移動させて、前記サブストレート上にサンプル材料のアレーを形成する前記1組の位置の各位置にナノリッター容量の流体を分配するステップを含むことを特徴とする前記方法。

55. 前記サブストレートが前記チャンバから放出された流体を受容すべく位置を規定するためにサブストレート上に形成されたウェルを有することを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

56. 前記サンプル材料が質量分析用マトリックス材料を含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

57. 更に、前記マトリックス材料を含む溶媒をサブストレート表面上で蒸発させて該サブストレート上にマトリックス材

料を沈着させるために所定時間待機するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第56項に記載の方法。

58. 更に、ナノリッター容量の分析対象材料を含む流体を蒸発させたマトリックス材料上に放出して前記マトリックス材料で溶解し、前記サブストレート上に結晶性構造物を形成させることを含むことを特徴とする請求の範囲第57項に記載の方法。

59. 前記サンプル材料が分析対象材料及び質量分析用マトリックス材料を含む溶媒からなることを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

60. 更に、沈着させたサンプル材料のアレーを前記サンプル材料の組成を示す情報を測定する診断ツールを用いて分析するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

61. 診断ツールが質量分析計であることを特徴とする請求の範囲第60項に

71. プラスチック材料からなるサブストレート材料を用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

72. 膜からなるサブストレートを用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

73. ポリマー材料からなるサブストレートを用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

74. 金属をグラフトしたポリマーからなるサブストレートを用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

75. 化学的に官能化させたサブストレート材料であるサブストレートを用意するステップを含むことを特徴とする請求の

範囲第54項に記載の方法。

76. ビーズで官能化させたサブストレートを用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

77. 樹枝状材料で官能化させたサブストレートを用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

78. 材料を分析する方法であって、

溶媒中に前記材料を含む流体を含むベシクルを用意するステップ、

前記ベシクルと表面を接触させることなく、前記サブストレート表面の第1位置に近接して前記ベシクルを配置するステップ、

前記サブストレート表面の第1位置で特定且つ調整されたナノリッター容量の流体を送達するステップ、

前記ベシクルを前記サブストレート表面上の第1位置の次の第2位置に移動させ、前記サブストレート表面上の位置のアレーに沿って特定且つ調整された容量の材料を分配して材料のアレーを形成するステップ、及び

前記アレーの各位置の材料について質量分析を実施するステ

ップを含むことを特徴とする前記方法。

79. 前記ベシクルを用意するステップが、マトリックス材料及び分析対象材

記載の方法。

62. 前記ベシクルが更に、ナノリッター容量の流体をチャンバから放出させるための圧力を与える圧電要素を含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

63. 前記ベシクルを移動させるステップが、前記ベシクルを前記サブストレート表面を横断してラスタさせるステップを含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

64. ベシクルアセンブリの前記ベシクル部分か、サブストレート表面上の第1の複数位置に流体を分配するためにマトリックスに配置された複数のベシクルを有することを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

65. 前記ベシクルを移動させるステップが、ベシクルを含むベシクルアセンブリを第1の複数位置に隣接する位置に移動させるための距離を示すオフセット信号を測定するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第64項に記載の方法。

66. 前記ベシクルを移動させるステップが、前記ベシクルアセンブリを前記サブストレート表面上に移動させ、前記ベシクルアセンブリから流体を分配して放出される流体を有する位置のマトリックスを形成するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第65項に記載の方法。

67. 更に、洗浄流体を前記ベシクルのチャンバに抜き取って前記チャンバを濯ぐステップを含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

68. 更に、前記チャンバを毛管作用で満たすために前記ベシクルを流体材料ソースと接触させるステップを含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

69. シリコンからなるサブストレート材料を用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

70. 金属材料からなるサブストレート材料を用意するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

料を混合して前記材料を含む流体を調製するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第78項に記載の方法。

80. 流体を保持するのに適当な内部チャンバを有するベシクルを用意するステップを含み、前記材料が質量分析用マトリックス材料を含むことを特徴とする請求の範囲第78項に記載の方法。

81. 前記質量分析を実施するステップがマトリックスによるレーザー脱離イオン化質量分析を実施するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第78項に記載の方法。

82. 前記質量分析を実施するステップが飛行時間型質量分析を実施するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第78項に記載の方法。

83. 前記質量分析を実施するステップがフーリエ変換質量分析を実施するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第78項に記載の方法。

84. サブストレート表面上にサンプル材料のアレーを形成

するためのシステムであって、

ナノリッターの流体を運ぶのに適当な遠位端部を有するベシクル、

前記ベシクルを移動させるために取り付けられた遠位部分を有する可動性アーム、

前記ベシクルを前記サブストレート表面上の第1位置に近接して配置すべく前記アームを移動させるための及び前記サブストレート表面の第1位置でナノリッター容量の流体を与えるべく前記ベシクルをコントロールするためのコントローラ、及び 前記材料の化学的組成を示す組成信号を発生させることにより前記サブストレート表面上に沈着させた材料を分析するための診断ツールを含む前記システム。

85. 前記ベシクルは材料の中実軸を含むことを特徴とする請求の範囲第84項に記載のシステム。

86. 前記ベシクルは流体材料を運ぶのに適した内部チャンバを含むことを特徴とする請求の範囲第84項に記載のシステム。

87. 前記ベシクルがチャンバと前記チャンバから流体を放出するためのトラ

ンスデューサ要素とを含むことを特徴とする

請求の範囲第84項に記載のシステム。

88. 前記診断ツールが質量分析計を含むことを特徴とする請求の範囲第41項に記載のシステム。

89. 質量分析用マトリックス材料または前記マトリックス材料とサブストレート上の離れた位置に沈着した分析対象物質との混合物から選択されるサンプル材料のアレーを含む表面を有するサブストレートであって、各位置のマトリックス材料が結晶構造物を形成し、表面上にナノリッター容量の材料の沈着により生じた量を含むことを特徴とする前記サブストレート。

90. 前記表面上に配置したウェルを有し、前記サンプル材料が前記ウェル内に沈着されていることを特徴とする請求の範囲第89項に記載のサブストレート。

91. 前記表面にビットが形成されていることを特徴とする請求の範囲第90項に記載のサブストレート。

92. 前記表面が粗な内表面を有していることを特徴とする請求の範囲第90項に記載のサブストレート。

93. ナノリッター容量の材料をサブストレート表面上にアレーとして分配する方法であって、

(a)液体を分配するための、各々が材料を含む流体を収容する内

部チャンバを有するベシクルの複数個をアレーの形態で配置して含むアセンブリを用意するステップ、

(b)前記ベシクルを表面と接触させることなく、前記サブストレート表面に近接する第1組の位置でベシクルを整列するステップ、

(c)ナノリッター容量の流体を各ベシクルから前記ベシクルと整列させたサブストレート表面上に放出させるために、機械的圧力を用いて各チャンバをコントロールして、流体のアレーをサブストレート表面上に沈着させることを特徴とする前記方法。

溶媒を蒸発させて前記表面上に沈着した分析対象材料を残すために所定期間待機するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第100項に記載の方法。

102. 更に、分析対象物が沈着される同じ位置でステップ(a)~(c)を繰り返すことを含み、前記アセンブリ中のベシクルのチャンバが、分析対象物のアレー上に放出すると分析対象物に溶解するマトリックス材料を含む溶媒を収容していることを特徴とする請求の範囲第101項に記載の方法。

103. 流体が溶媒中に分析対象物を含み、

更にサブストレート表面上に放出された流体から分析対象物を含む溶媒を蒸発させて前記表面上に沈着した分析対象材料を残すために所定期間待機するステップを含み、

分析対象物が沈着される同じ位置でステップ(a)~(f)を繰り返し、前記アセンブリ中のベシクルのチャンバが、分析対象物のアレー上に放出すると分析対象物に溶解するマトリックス材料を含む溶媒を収容していることを特徴とする請求の範囲第94項に記載の方法。

104. 前記流体が分析対象材料及びマトリックス材料の混合物を含むことを特徴とする請求の範囲第93項に記載の方法。

105. 更に、サブストレート上に沈着させた材料のアレーを有するサブストレートを沈着させた材料の組成を示す情報を測定する診断ツールに付けるステップを含むことを特徴とする請求の範囲第93項に記載の方法。

106. 診断ツールが質量分析計であることを特徴とする請求の範囲第105項に記載の方法。

107. 前記アセンブリを移動させるステップが、前記アセンブリを前記サブストレート表面を横断してラスタースさせるステップを含むことを特徴とする請求の範囲第94項に記載の方法。

108. 前記アセンブリを移動させるステップが、第1組の複数位置に近接する位置にベシクルを整列させるべくアセンブリを移動させるための距離を示すオフセット信号を測定するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第94項に記載の方法。

94. 更に、

(d)サブストレート表面に隣接する第2組の位置でベシクルを整列させるために前記ステップ(a)のアセンブリを移動させるステップ、

(e)ステップ(c)を繰り返すステップ、及び

(f)任意にステップ(d)及び(e)を繰り返して、サブストレート表面上の更なる組の位置で流体を分配するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第93項に記載の方法。

95. 前記サブストレートが、ベシクルから放出される流体を受容するための位置を規定するためにサブストレート表面上

に形成されたウェルを有することを特徴とする請求の範囲第93項に記載の方法。

96. 前記流体が溶媒及びマトリックス材料を含むことを特徴とする請求の範囲第93項に記載の方法。

97. 更に、サブストレート表面上に放出した流体からマトリックス材料を含む溶媒を蒸発させて該表面上に沈着させたマトリックス材料を残すために所定期間待機するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第96項に記載の方法。

98. 更に、マトリックス材料が沈着される同じ位置でステップ(a)~(c)を繰り返すことを含み、前記アセンブリ中のベシクルのチャンバが、マトリックス材料のアレー上に放出するとマトリックス内に溶解する分析対象材料を含む溶媒を収容していることを特徴とする請求の範囲第97項に記載の方法。

99. マトリックス材料が沈着される同じ位置でステップ(a)~(f)を繰り返し、前記アセンブリ中のベシクルのチャンバが、マトリックス材料のアレー上に放出するとマトリックス内に溶解する分析対象材料を含む溶媒を収容していることを特徴とする請求の範囲第97項に記載の方法。

100. 前記流体が溶媒中に分析対象物を含むことを特徴と

する請求の範囲第93項に記載の方法。

101. 更に、サブストレート表面上に放出された流体から分析対象物を含む

109. 更に、チャンバを濯ぐべく洗浄流体をチャンバに抜き取るステップを含むことを特徴とする請求の範囲第93項に

記載の方法。

110. 各ベシクルが、チャンバを毛管作用により流体で少なくとも部分的に満たすために十分に狭い径を含むチャンバを有するピンからなり、

チャンバを毛管作用によりある容量の流体で少なくとも部分的に満たすべく前記アセンブリのベシクルが流体ソースと接触していることを特徴とする請求の範囲第93項に記載の方法。

111. ベシクルのチャンバが圧力源に接続しており、

チャンバを毛管作用により満たす流体容量を部分的に補償すべく圧力源からの正圧をチャンバに加えることを特徴とする請求の範囲第110項に記載の方法。

112. ベシクルのチャンバがチャンバに負圧を加える圧力源に接続しており、

チャンバを負圧によりある容量の流体で少なくとも部分的に満たすために流体ソースと接触させることにより流体をベシクルに導入することを特徴とする請求の範囲第93項に記載の方法。

113. 前記サブストレートがシリカ、ガラス、セルロース、シリコン金属、プラスチック、ポリマー及び金属をグラフトし

たポリマーからなる群から選択される材料からなることを特徴とする請求の範囲第93項に記載の方法。

114. 前記サブストレートが平坦表面、ビット付き平坦表面、中実または多孔性ビーズ、膜またはピンからなることを特徴とする請求の範囲第93項に記載の方法。

115. 前記サブストレート表面を化学的に官能化、ビーズで官能化またはデンドライト捕捉材料で官能化されていることを特徴とする請求の範囲第93項に記載の方法。

116. 前記流体がオリゴヌクレオチドを含むことを特徴とする請求の範囲第

93項に記載の方法。

117. 前記ベシクルのチャンバが圧力源に接続しており、前記圧力源により正圧を前記ベシクルのチャンバに加えることにより流体を放出させるためにベシクルをコントロールすることを特徴とする請求の範囲第93項に記載の方法。

118. 前記ベシクルのチャンバ内の圧力が該ベシクルから流体スプレーを放出するのに十分であることを特徴とする請求の範囲第117項に記載の方法。

119. 前記ベシクルのチャンバ内の圧力が該ベシクルから流体液滴を放出すべく選択されることを特徴とする請求の範囲

第117項に記載の方法。

120. 前記アセンブリの各ベシクルが、流体をサブストレート表面に導くための毛細管要素と流体を分配すべくベシクルに圧力を加えるためのトランスデューサ要素とを有するアセンブリを含むことを特徴とする請求の範囲第93項に記載の方法。

121. 前記トランスデューサ要素が前記毛細管の周りに配置されており、電気パルスを変換して毛細管を機械的に変形させ、毛細管から流体を放出させることを特徴とする請求の範囲第120項に記載の方法。

122. 前記トランスデューサ要素が圧電、電気、電気制限、磁気制限及び電気機械トランスデューサからなる群から選択されることを特徴とする請求の範囲第120項に記載の方法。

123. ナノリッター容量の材料をサブストレート表面上にアレーとして分配する方法であって、

(a) 液体を分配するために、ナノリッター容量の流体を保持するために端部を有する材料の中実軸を含む細長いベシクルを複数個アレーとして配置して有するピンアセンブリを用意するステップ、

(b) ナノリッター容量の液体材料を含む流体を流体ソースから

前記ピンアセンブリのベシクルの端部に充填するステップ、

(c) 前記ベシクルを表面に接触させることなく、前記サブストレート表面に近接

129. 溶媒の材料が分析対象材料を含むことを特徴とする請求の範囲第123項に記載の方法。

130. 更に、分析対象材料を含む溶媒を蒸発させて該分析対象材料を前記表面上に沈着させるために所定期間待機するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第129項に記載の

方法。

131. ステップ(a)～(d)をマトリックス材料を含む溶媒を収容したベシクルを用いて繰り返し、

前記ベシクルの端部のマトリックス材料の流体をサブストレート表面上の蒸発させた分析対象材料と接触させて前記マトリックス材料を分析対象材料で溶解し、マトリックス材料と分析対象材料の混合物を沈着させることを特徴とする請求の範囲第130項に記載の方法。

132. 溶媒の材料が分析対象材料とマトリックス材料の混合物を含むことを特徴とする請求の範囲第123項に記載の方法。

133. 更に、サブストレート上に沈着させた材料のアレーを有するサブストレートを前記材料の組成を示す情報を測定する診断ツールに付けるステップを含むことを特徴とする請求の範囲第123項に記載の方法。

134. 前記診断ツールが質量分析計を含むことを特徴とする請求の範囲第133項に記載の方法。

135. 前記ピンアセンブリを移動させるステップが、前記ピンアセンブリを前記サブストレート表面を横断してラスタ

させるステップを含むことを特徴とする請求の範囲第124項に記載の方法。

136. 前記ピンアセンブリを移動させるステップが、第1の複数位置に近接する位置でベシクルを整列させるべくピンアセンブリを移動させるための距離を示すオフセット信号を測定するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第124項に記載の方法。

137. 前記サブストレートがシリカ、ガラス、セルロース、シリコン金属、

する第1組の位置にベシクルを整列させるためにピンアセンブリを配置するステップ、

(d) 充填した流体を前記ベシクルと整列させたサブストレート表面に接触させて、サブストレート表面上に材料のアレーを形成するステップを含むことを特徴とする前記方法。

124. 更に、

(e) ステップ(b)を繰り返すステップ、

(f) サブストレート表面に近接し且つ第1組の位置に隣接する第2組の位置でベシクルを整列させるためにピンアセンブリを移動させるステップ、

(g) ステップ(d)を繰り返すステップ、

(h) 任意に、ステップ(e)～(g)を繰り返してサブストレート上の別の位置で材料を分配するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第123項に記載の方法。

125. 前記サブストレートが、ベシクルから放出される流体を受容するための位置を規定するためにサブストレート表面上に形成されたウェルを有することを特徴とする請求の範囲第

123項に記載の方法。

126. 前記溶媒が質量分析用マトリックス材料を含むことを特徴とする請求の範囲第123項に記載の方法。

127. 更に、マトリックス材料を含む溶媒を蒸発させて該マトリックス材料を前記表面上に沈着させるために所定期間待機するステップを含むことを特徴とする請求の範囲第126項に記載の方法。

128. ステップ(a)～(d)を分析対象材料を含む溶媒を収容するベシクルを用いて繰り返し、

前記ベシクルの端部の分析対象材料の流体をサブストレート表面上の蒸発させたマトリックス材料と接触させて前記マトリックス材料を分析対象材料で溶解し、マトリックス材料と分析対象材料の混合物を沈着させることを特徴とする請求の範囲第127項に記載の方法。

プラスチック、ポリマー及び金属をグラフトしたポリマーからなる群から選択される材料からなることを特徴とする請求の範囲第123項に記載の方法。

138. 前記サブストレートが平坦表面、ピット付き平坦表面、中実または多孔性ビーズ、膜またはピンからなることを特徴とする請求の範囲第123項に記載の方法。

139. 前記サブストレート表面を化学的に官能化、ビーズで官能化またはデンドライト捕捉材料で官能化されていることを特徴とする請求の範囲第123項に記載の方法。

140. 前記ベシクルがベシクル要素の部分アセンブリであり、各ベシクルがナノリッター容量の流体を保持する内部チャ

ンバを含むことを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

141. ベシクルが内部チャンバ内の圧力をコントロールする圧力源に接続した内部チャンバを有するハウジングの内側にあり、

前記圧力源が、各ベシクルの内部チャンバを介する流体の流れを調節してベシクルから特定ナノリッター容量の流体を分配するためにハウジングのチャンバに圧力を加えることを特徴とする請求の範囲第140項に記載の方法。

142. 前記ベシクルは内部チャンバを有し、複数のベシクルとチャンバを変形することにより流体を放出させるべく内部チャンバを介して流体を動かすために各ベシクルに取り付けられたトランスデューサ要素を含むアセンブリの一部を形成し、前記トランスデューサ要素は十分な圧力でチャンバを変形して、ピンから流体をスプレーさせるかまたはチャンバから流体液滴を伸長させて該液滴をサブストレート表面に接触させることにより流体をサブストレートに対して流し得ることを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

143. 自動化されることを特徴とする請求の範囲第54項に記載の方法。

144. 共有結合が形成されるような条件下でチオール含有核酸をチオール反応性基を含む固体支持体と反応させて、不溶性支持体上に核酸を固定化し、生じた共有結合及び支持体はレーザー脱離に対して安定であり、

前記支持体がシリコン支持体でありまたはシリコン表面もしくは二酸化ケイ素表面を含むことを特徴とする前記方法。

145. 前記反応が約25〜約100℃で行われることを特徴とする請求の範囲第144項に記載の方法。

146. 前記したチオール反応性基を含む支持体が、シリコン支持体またはシリコンもしくは二酸化ケイ素表面を含む支持体をチオール反応性架橋剤と反応させてチオール反応性基を含む固体支持体を形成することにより作成されることを特徴とする請求の範囲第144項に記載の方法。

147. 前記チオール反応性架橋剤がN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノペンゾエート(SIAB)であることを特徴とする請求の範囲第145項に記載の方法。

148. 不溶性固体シリコン支持体上に核酸を固定化する方法であって、

共有結合が形成されるような条件下でチオール含有固体支持体をチオール反応性基を含む核酸と反応させて、レーザー脱離に対して安定な共有結合を介して前記支持体上に核酸を固定化し、

前記支持体がシリコン支持体またはシリコンもしくは二酸化ケイ素表面を含むことを特徴とする前記方法。

149. 前記チオール含有不溶性支持体が不溶性支持体をチオール含有試薬で修飾することにより作成されることを特徴とする請求の範囲第148項に記載の方法。

150. 支持体表面に250 fmol/mm<sup>2</sup>の密度で結合した核酸を含む不溶性支持体であって、前記核酸が少なくとも1個の硫黄原子を介して共有結合されており、前記共有結合がレーザー脱離に対して安定であることを特徴とする前記支持体。

151. 不溶性支持体表面に少なくとも20 fmol/mm<sup>2</sup>の密度で共有結合した核酸を含む不溶性支持体であって、

前記した核酸を結合して含む支持体がレーザー脱離に対して安定であり、

前記支持体がシリコン支持体であるかまたはシリコンもしくは二酸化ケイ素表

面を有する支持体であることを特徴とする前記方法。

前記支持体上の第1位置にナノリッター容量の液体を分配するために前記ベシクルまたはベシクルのアレーをコントロールし、

前記ベシクルまたはベシクルのアレーを前記支持体表面上の前記1組の位置の残りの各位置に移動させ、

前記1組の各位置で液体を送達して支持体表面上にチオール反応性基のアレーを形成することを伴うプロセスにより生成さ

せることを特徴とする請求の範囲第156項に記載の方法。

158. 前記溶液が、前記支持体表面上の前記組の位置で第1級アミンを生成させるために3-アミノプロピルトリエタキシランを含有する第1溶液と前記支持体表面を前記1組の位置でヨードアセトアミド官能基で誘導化するためにN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノペンゾエート(SIAB)を含有する第2溶液とを含み、

前記第1溶液をまず前記1組の位置の各位置に別々に送達し、次いで前記第2溶液を前記1組の位置の各位置に別々に送達させるように上記プロセスを繰り返すことを特徴とする請求の範囲第157項に記載の方法。

159. 更に、チオール反応性基を含む前記1組の位置で前記チオール含有核酸を不溶性支持体の表面と接触させて、共有結合させた核酸のアレーを含む固体支持体を作成し、

前記ベシクルを前記サブストレート表面上の第1位置に近接して配置し、

前記支持体表面の第1位置にある容量の液体を送達させるために前記ベシクルをコントロールし、

前記ベシクルを支持体上の前記1組の位置の残りの各位置に

移動させ、

前記1組の各位置で液体を送達させることを含むことを特徴とする請求の範囲第157項に記載の方法。

160. 支持体表面上に核酸のアレーを作成する方法であって、

シリコン支持体またはシリコン表面を有する支持体の表面を3-アミノプロピ

面を有する支持体であることを特徴とする前

記支持体。

152. i) チオール反応性架橋剤及びii) 表面修飾剤と反応性であるかまたはチオール反応性架橋剤と反応性の表面を有する不溶性支持体を含むキットであって、前記支持体がシリコン支持体であるかまたはシリコン表面もしくは二酸化ケイ素表面を含むことを特徴とする前記キット。

153. 更に、チオール反応性架橋剤と反応し得る官能基で支持体の表面を修飾させるための表面修飾剤を含むことを特徴とする請求の範囲第152項に記載のキット。

154. 共有結合した核酸分子のアレーを含むシリコンウェハを含むキットであって、

前記共有結合がレーザー脱離に対して安定であり、

前記核酸分子がアレー上のある位置で少なくとも約20 fmol/mm<sup>2</sup>の密度で結合していることを特徴とする前記キット。

155. チオール部分を含む支持体表面の修飾剤及び支持体のチオール部分と反応し得るチオール反応性架橋剤を含むキット。

156. 支持体表面上に核酸のアレーを形成する方法であっ

て、

チオール含有核酸を、その表面の1組の複数位置に位置するチオール反応性基を含む不溶性固体支持体と接触させて、前記支持体表面上に核酸アレーを形成することを特徴とする前記方法。

157. 前記支持体表面上のチオール反応性基を、

液体を分配するために、ナノリッター容量の液体を保持するための内部チャンバを有し、支持体表面上にチオール反応性基を生成させるための溶液を収容したベシクルまたはベシクルのアレーを用意し、

前記ベシクルまたはベシクルのアレーを支持体表面上の第1位置に近接して配置し、

ルトリエタキシランの溶液と反応させて、前記支持体表面上に第1級アミンの均一層を形成し、

前記第1級アミンの均一層をN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノペンゾエート(SIAB)の溶液と反応させることにより前記支持体の表面をヨードアセトアミド官能基で誘導化し、

前記支持体表面をチオール含有核酸と接触させて、前記チオール含有核酸を支持体表面上に固定化することを特徴とする前記方法。

161. 前記チオール含有核酸を、

液体を分配するために、チオール含有核酸を収容するための内部を有するベシクルまたはベシクルのアレーを用意し、

前記ベシクルまたはベシクルのアレーを支持体表面上の第1

位置に近接して配置し、

前記支持体表面上の第1位置にある容量の液体を分配するために前記ベシクルまたはベシクルのアレーをコントロールし、前記ベシクルまたはベシクルのアレーを支持体上の前記1組の位置の残りの各位置に移動させ、

前記1組の位置の各位置で液体を送達して支持体表面に共有結合させた核酸のアレーを形成することを伴うプロセスにより支持体上の1組の位置で接触させることを特徴とする請求の範囲第160項に記載の方法。

162. 支持体表面上にチオール結合を介して結合させた核酸のアレーを含み、請求の範囲第156項に記載の方法により作成されることを特徴とする不溶性シリコン支持体またはシリコン表面を有する支持体。

163. 前記チオール含有核酸を、オリゴヌクレオチドプライマーが3'-または5'-ジスルフィド結合を含む反応で核酸を増幅させ、増幅させた核酸の1つの鎖の3'-または5'-ジスルフィド結合を還元してチオール含有核酸を生成させることにより生成することを特徴とする請求の範囲第144項に記載の方法。

164. 前記不溶性支持体をチオール含有核酸と反応させる前に、前記不溶性

支持体を3-アミノプロピルトリエタキシランを含む溶液と接触させて不溶性支持体の表面上に第1級アミンの均一層を形成し、

前記第1級アミンの均一層をN-スクシニミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)の溶液と反応させることにより前記不溶性支持体の表面をヨードアセトアミド官能基で誘導化し、

前記支持体表面を核酸のチオール含有鎖と接触させて、チオール含有核酸のチオール基と支持体表面上のヨードアセトアミド官能基との間の共有結合により前記チオール含有核酸を支持体表面上に固定化することとを特徴とする請求の範囲第144項に記載の方法。

165. 更に、

前記の固定化したチオール含有核酸の一部と相補的な一本鎖核酸をハイブリダイズし、

ハイブリダイズした一本鎖核酸の分子量を質量分析を用いて測定することを含むことを特徴とする請求の範囲第144項に記載の方法。

166. 核酸標的を検出する方法であって、

不溶性支持体の表面を3-アミノプロピルトリエタキシランの溶液と反応させて前記支持体の表面上に第1級アミンの均一層を形成し、

前記第1級アミンの均一層をN-スクシニミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)の溶液と反応させることにより前記支持体表面をヨードアセトアミド官能基で誘導化し、

1つ以上の核酸標的分子を、1つのオリゴヌクレオチドプライマーが3'-または5'-ジスルフィド結合を含む複数のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて増幅させ、

前記増幅させた核酸分子の3'-または5'-ジスルフィド結合を還元して遊離チオール基を生成し、

前記した増幅核酸標的分子を変性し、

前記支持体表面を核酸の遊離チオール基含有鎖と反応させて、遊離チオール含有核酸鎖のチオール基と支持体表面に対して誘導化したヨードアセトアミド官能

チオール基と支持体表面上のヨードアセトアミド官能基との間の共有結合により前記チオール含有核酸を支持体表面上に固定化し、

固定化したチオール含有核酸の一部に相補的な一本鎖核酸をハイブリダイズし、

ハイブリダイズした一本鎖核酸の3'-末端に少なくとも1つのヌクレオチドを核酸合成により付加して、核酸を支持体表面上で合成することとを特徴とする前記方法。

171. 前記固定化核酸をアレーの形態で支持体上に配置することとを特徴とする請求の範囲第170項に記載の方法。

172. 更に、核酸合成中に1つ以上のジデオキシヌクレオシドトリホスフェートを付加することを含むことを特徴とする請求の範囲第170項に記載の方法。

173. 更に、少なくとも1つのヌクレオチドが付加された一本鎖核酸の分子量を質量分析法により測定することを含むことを特徴とする請求の範囲第170項に記載の方法。

174. 前記質量分析法が、マトリックスによるレーザー脱離/イオン化、飛行時間型(MALDI-TOF)分析、エレクトロスプレー(ES)、イオンサイクロトロン共鳴(ICR)及びフーリエ変換からなる群から選択されることを特徴とする請求の範囲第173項に記載の方法。

175. 更に、

固定化したチオール含有核酸の一部に相補的な一本鎖核酸をハイブリダイズし、

ハイブリダイズした一本鎖核酸の3'-末端に少なくとも1つのデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドを酵素的核酸合成により付加し、

少なくとも1つのデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドが付加されたハイブリダイズ一本鎖核酸の分子量を

質量分析により測定して、支持体表面上に固定化した核酸の少なくとも一部の配

基との間の共有結合により前記チオール含有核酸を支持体表面に対して固定化し、

固定化したチオール含有核酸の一部に相補的な一本鎖核酸を

ハイブリダイズし、

前記サブストレート表面にマトリックス材料を添加し、

ハイブリダイズした一本鎖核酸の分子量を質量分析により測定することとを特徴とする前記方法。

167. 前記質量分析法分析が、マトリックスによるレーザー脱離/イオン化、飛行時間型(MALDI-TOF)分析、エレクトロスプレー(ES)、イオンサイクロトロン共鳴(ICR)及びフーリエ変換からなる群から選択されることを特徴とする請求の範囲第166項に記載の方法。

168. 前記チオール含有核酸を支持体表面上にアレーの形態で固定化することとを特徴とする請求の範囲第166項に記載の方法。

169. 更に、

固定化したチオール含有核酸の一部に相補的な一本鎖核酸をハイブリダイズし、

ハイブリダイズした一本鎖核酸の3'-末端に少なくとも1つのヌクレオチドを核酸合成により付加して、核酸を支持体表面上で合成することとを特徴とする請求の範囲第144項に記載の方法。

170. 支持体表面上で核酸を合成する方法であって、

シリコン支持体またはシリコン表面を有する支持体の表面を3-アミノプロピルトリエタキシランの溶液と反応させて前記支持体の表面上に第1級アミンの均一層を形成し、

前記第1級アミンの均一層をN-スクシニミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)の溶液と反応させることにより前記支持体の表面をヨードアセトアミド官能基で誘導化し、

前記支持体の表面を核酸のチオール含有鎖と接触させて、チオール含有核酸の

列を決定することを含むことを特徴とする請求の範囲第144項に記載の方法。

176. 核酸を配列決定する方法であって、

シリコン支持体またはシリコン表面を有する支持体の表面を3-アミノプロピルトリエタキシランの溶液と反応させて前記支持体の表面上に第1級アミンの均一層を形成し、

前記第1級アミンの均一層をN-スクシニミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)の溶液と反応させることにより前記支持体の表面をヨードアセトアミド官能基で誘導化し、

前記支持体の表面を核酸のチオール含有鎖と接触させて、チオール含有核酸のチオール基と支持体表面上で誘導化したヨードアセトアミド官能基との間の共有結合により前記チオール含有核酸を支持体表面上に固定化し、

固定化したチオール含有核酸の一部に相補的な一本鎖核酸をハイブリダイズし、

1つ以上のジデオキシヌクレオチドを含む適当なデオキシヌクレオチド混合物の存在下で核酸合成を実施して、ハイブリダ

イズした一本鎖核酸の3'-末端に少なくとも1つのデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドを酵素的核酸合成により付加し、

酵素的に付加したデオキシヌクレオチドまたはジデオキシヌクレオチドを含むハイブリダイズ一本鎖核酸の分子量を質量分析により測定して、前記配列中の少なくとも1つの塩基を決定することを含むことを特徴とする前記方法。

177. 前記質量分析法が、マトリックスによるレーザー脱離/イオン化、飛行時間型(MALDI-TOF)分析、エレクトロスプレー(ES)、イオンサイクロトロン共鳴(ICR)及びフーリエ変換からなる群から選択されることを特徴とする請求の範囲第175項または176項に記載の方法。

178. 前記固定化核酸が支持体上にアレーの形態で配置されることを特徴とする請求の範囲第175項または176項に記載の方法。

179. 前記固定化核酸のアレーを含む不溶性支持体であって、

前記支持体の表面を3-アミノプロピルトリエタキシランの溶液と接触させ

て前記支持体の表面上に第1級アミンの均一

層を形成し、

前記第1級アミンの均一層をN-スクシンイミジル(4-ヨードアセチル)アミノベンゾエート(SIAB)の溶液と反応させることにより前記支持体の表面をヨードアセトアミド官能基で誘導化し、

前記支持体をチオール含有核酸と反応させて、チオール含有核酸鎖のチオール基と支持体表面に誘導化したヨードアセトアミド官能基との間の共有結合により前記チオール含有核酸を支持体表面上の所定の1組の位置で該表面に対して固定化することを含むプロセスにより製造されることを特徴とする前記不溶性支持体。

180. 前記核酸を前記支持体上にアレーの形態で配置することを特徴とする請求の範囲第150項に記載の不溶性支持体。

181. 前記核酸を前記支持体上にアレーの形態で配置することを特徴とする請求の範囲第151項に記載の不溶性支持体。

182. 不溶性シリコン表面またはシリコン表面を有する支持体であって、前記支持体の表面にチオール結合を介して結合させた核酸のアレーを含み、請求の範囲第160項に記載の方法により製造されることを特徴とする前記不溶性支持体。

183. 前記支持体がシリコンウェハであることを特徴とする請求の範囲第144項に記載の方法。

184. 核酸が表面または核酸が固定化された表面部分1mm<sup>2</sup>あたり少なくとも100fmolの密度で固定化されていることを特徴とする請求の範囲第144項または第148項に記載の方法。

185. 核酸が表面または核酸が固定化された表面部分1mm<sup>2</sup>あたり少なくとも250fmolの密度で固定化されていることを特徴とする請求の範囲第144項または第148項に記載の方法。

186. 請求の範囲第144項または第148項に記載の方法で製造されるこ

とを特徴とする共有結合した核酸を含む固体支持体。

187. 核酸が表面1mm<sup>2</sup>あたり少なくとも100fmolの密度で固定化されていることを特徴とする請求の範囲第186項に記載の方法。

188. 核酸が表面1mm<sup>2</sup>あたり少なくとも250fmolの密度で固定化されていることを特徴とする請求の範囲第186項に記載の方法。

## フロントページの続き

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テームト(参考)
G 0 1 N 33/566		C 1 2 N 15/00	Z N A A

(31)優先権主張番号 08/787, 639  
 (32)優先日 平成9年1月23日(1997. 1. 23)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 947, 801  
 (32)優先日 平成9年10月8日(1997. 10. 8)  
 (33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW

(72)発明者 リトル, ダニエル・ビー  
 アメリカ合衆国、ペンシルバニア・18668、  
 バットン、グレンデイル・レイク・ロード・393

(72)発明者 ケスター, フーベルト  
 アメリカ合衆国、カリフォルニア・92037、  
 ラ・ジヨラ、ピア・マロルカ・ドライ  
 ブ・8636・シー

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C07H21/00 C1201/68		Int. l. Application No. PCT/US 97/20195
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C07H C12Q B01J		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 90 01564 A (MICROPROBE CORP) 22 February 1990	1-40
Y	see the whole document	1-40
A	see claims 1, 24, 46, 52, 68	107
X	US 5 547 835 A (KOSTER HUBERT) 20 August 1996	1, 5, 13, 20
Y	see column 10, line 1 - column 11, line 10	1-40
	see column 13, line 15 - line 20	
	see example 1	
A	see claim 1	107
- / -		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 August 1998		Date of mailing of the international search report 03. 09. 98
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel.: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 631 apo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Scott, J

Form PCTASA/210 (second sheet) (July 1992)



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. l. Application No.

PCT/US 97/20195

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BATISTA-VIERA F ET AL: "A NEW METHOD FOR REVERSIBLE IMMOBILIZATION OF THIOL BIOMOLECULES BASED ON SOLID-PHASE BOUND THIOLSULFONATE GROUPS" APPLIED BIOCHEMISTRY AND BIOTECHNOLOGY, vol. 31, no. 2, 1 November 1991, pages 175-195, XP000579322	1,3,5-7
Y	see the whole document	1-40
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 8844 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class A96, AN 88-311964 XP002061833 & JP 63 230 086 A (NITTO ELECTRIC IND CO) , 26 September 1988	1,3
Y	see abstract	1-40
X	R.ZUCKERMANN ET AL.: "Efficient Methods for Attachment of Thiol Specific Probes to the 3'-Ends of Synthetic Oligodeoxyribonucleotides." NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol. 15, no. 13, 10 July 1987, pages 5305-5321, XP002061832 see the whole document	1,3
Y	WO 93 09668 A (AFFYMAX TECH NV) 27 May 1993	1-40
A	see the whole document	83,113, 118
A	see claims 18,24-26	41,65
Y	DATABASE WPI Section Ch, Week 9040 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 90-302767 XP002061834 & JP 02 215 399 A (SHIMADZU SEISAKUSHO KK) , 28 August 1990	1-40
A	see abstract	107
Y	WO 89 12624 A (CETUS CORP) 28 December 1989 see the whole document	1-40
Y	WO 95 13538 A (OPERON TECHNOLOGIES INC) 18 May 1995 see the whole document	1-40
A	see page 12 - page 13	41,65
A	see claims 19,20	83,118
Y	GB 2 017 105 A (J.K.WELTMAN) 3 October 1979	1-40
A	see the whole document	107

-/--

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 Int'l. Application No.  
PCT/US 97/20195

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 89 11270 A (SANDOZ AG) 30 November 1989 see the whole document	1-40
A	US 5 077 210 A (EIGLER FRANCES S ET AL) 31 December 1991 see abstract; figure 1	1
A	ARSHADY E: "BEADED POLYMER SUPPORTS AND GELS II. PHYSICO-CHEMICAL CRITERIA AND FUNCTIONALIZATION" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 586, no. 2, 22 November 1991, pages 199-219, XP000247969	1
A	see the whole document	83,113, 118
A	ARSHADY R: "BEADED POLYMER SUPPORTS AND GELS I. MANUFACTURING TECHNIQUES" JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, vol. 586, no. 2, 22 November 1991, pages 181-197, XP000247968 see the whole document	1,83, 113,118
A	PON R T ET AL: "DERIVATIZATION OF CONTROLLED PORE GLASS BEADS FOR SOLID PHASE OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS" BIOTECHNIQUES, vol. 6, no. 8, 1 January 1988, pages 768-770, 773 - 775, XP000562920 see abstract	1
A	WO 92 07879 A (MINNESOTA MINING & MFG) 14 May 1992 see claims 1-10	1
A	MANOHARAN M ET AL: "A 2'-O-THIOL TETHER IN THE RIBOSE MOIETY OF NUCLEIC ACIDS FOR CONJUGATION CHEMISTRY" GENE, vol. 149, 1994, pages 147-156, XP002049798 see the whole document	1
A	TOSHIO HAYASHI ET AL: "IMMOBILIZATION OF THIOL PROTEASES ONTO POROUS POLY(VINYL ALCOHOL) BEADS" POLYMER JOURNAL, vol. 25, no. 5, 15 May 1993, pages 489-497, XP000398929 see abstract	1
A	WO 89 09406 A (SLEYTR UWE B ;SARA MARGIT (AT)) 5 October 1989 see abstract	41,65, 83,113, 118

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/US 97/20195

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 457 041 A (GINAVEN ROBERT O ET AL) 10 October 1995 see abstract ---	41,65
A	EP 0 339 781 A (BECKMAN INSTRUMENTS INC) 2 November 1989 see abstract ---	41,65
A	EP 0 500 506 A (SEAC SRL) 26 August 1992 see abstract ---	41,65, 107
A	US 5 312 233 A (TANNY MARK N ET AL) 17 May 1994 see abstract ---	41,65
A	WO 95 04524 A (OPPERBAS HOLDING BV ;BARENHOLZ YECHZKEL (IL); NUR ISRAEL (IL)) 16 February 1995 see claim 1 ---	83,113, 118
A	WO 84 02579 A (COOPER LIPOTECH INC) 5 July 1984 see the whole document ---	83,107, 113,118
A	WO 94 11735 A (SOINI ERKKI) 26 May 1994 see abstract ---	41,65, 107
P,X	US 5 622 824 A (KOESTER HUBERT) 22 Apr 11 1997 see the whole document ---	1-40
A		107
P,X	US 5 605 798 A (KOESTER HUBERT) 25 February 1997 see the whole document -----	1-40
A		107

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 97/ 20195

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

See further information sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☒ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

**1. Claims: 1-40**

A method of immobilizing a nucleic acid on a solid support; an insoluble support with the nucleic acid covalently bound to it; a kit for immobilizing the nucleic acid; a method for forming an array of nucleic acids on a substrate surface.

**2. Claims: 41-64**

A device for dispensing nanovolumes of fluid in chemical or biological procedures onto the surface of a substrate.

**3. Claims: 65-82**

A fluid dispensing device for dispensing a fluid in chemical or biological procedures into one or more wells of a multi-well substrate.

**4. Claims: 83-106**

A method for forming an array of sample material on the surface of a substrate according to the procedure of claim 83.

**5. Claims: 107-112**

A method for analyzing a material according to the procedure of claim 107.

**6. Claims: 113-117**

An apparatus for forming an array of a sample material on the surface of a substrate according to the procedure of claim 113.

**7. Claims: 118-121**

A substrate having a surface carrying an array of matrix material according to claim 118.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US 97/20195

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9001564	A	22-02-1990	NONE	
US 5547835	A	20-08-1996	US 5605798 A	25-02-1997
			US 5691141 A	25-11-1997
			AU 5992994 A	15-08-1994
			CA 2153387 A	21-07-1994
			EP 0679196 A	02-11-1995
			JP 8509857 T	22-10-1996
			WO 9416101 A	21-07-1994
WO 9309668	A	27-05-1993	US 5384261 A	24-01-1995
			US 5412087 A	02-05-1995
			AU 675054 B	23-01-1997
			AU 3148193 A	15-06-1993
			CA 2124087 A	27-05-1993
			EP 0624059 A	17-11-1994
			JP 7506561 T	20-07-1995
			US 5677195 A	14-10-1997
			AU 4110793 A	29-11-1993
			WO 9322680 A	11-11-1993
WO 8912624	A	28-12-1989	AT 120454 T	15-04-1995
			AU 631802 B	10-12-1992
			AU 3839089 A	12-01-1990
			DE 68921982 D	04-05-1995
			DE 68921982 T	24-08-1995
			EP 0428534 A	29-05-1991
			US 5241078 A	31-08-1993
WO 9513538	A	18-05-1995	NONE	
GB 2017105	A	03-10-1979	US 4218539 A	19-08-1980
			AU 4534479 A	27-09-1979
			BE 875064 A	24-09-1979
			CA 1120398 A	23-03-1982
			DE 2910998 A	04-10-1979
			FR 2420543 A	19-10-1979
			JP 55034087 A	10-03-1980
			JP 55120558 A	17-09-1980
			US 4251445 A	17-02-1981

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 97/20195

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8911270	A	30-11-1989	DE 68913003 D DE 68913003 T EP 0366770 A EP 0577146 A JP 3505576 T US 5258499 A	24-03-1994 09-06-1994 09-05-1990 05-01-1994 05-12-1991 02-11-1993
US 5077210	A	31-12-1991	NONE	
WO 9207879	A	14-05-1992	US 5200471 A CA 2093641 A CZ 9300773 A DE 69104727 D DE 69104727 T DK 556271 T EP 0556271 A JP 6501394 T	06-04-1993 06-05-1992 19-01-1994 24-11-1994 23-03-1995 06-03-1995 25-08-1993 17-02-1994
WO 8909406	A	05-10-1989	AT 123339 T AU 634960 B AU 3435789 A DE 58909265 D EP 0362339 A JP 2504282 T JP 2708590 B	15-06-1995 11-03-1993 16-10-1989 06-07-1995 11-04-1990 06-12-1990 04-02-1998
US 5457041	A	10-10-1995	NONE	
EP 0339781	A	02-11-1989	NONE	
EP 0500506	A	26-08-1992	IT 1246676 B	24-11-1994
US 5312233	A	17-05-1994	NONE	
WO 9504524	A	16-02-1995	AU 7384994 A CA 2168671 A EP 0713388 A EP 0815852 A JP 9501169 T	28-02-1995 16-02-1995 29-05-1996 07-01-1998 04-02-1997

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 97/20195

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8402579 A	05-07-1984	EP 0134222 A	20-03-1985
WO 9411735 A	26-05-1994	FI 925064 A	10-05-1994
		AU 5339394 A	08-06-1994
		EP 0626069 A	30-11-1994
		JP 7503325 T	06-04-1995
US 5622824 A	22-04-1997	AU 687801 B	05-03-1998
		AU 6411694 A	11-10-1994
		CA 2158642 A	29-09-1994
		EP 0689610 A	03-01-1996
		JP 8507926 T	27-08-1996
		WO 9421822 A	29-09-1994
US 5605798 A	25-02-1997	US 5547835 A	20-08-1996
		AU 5365196 A	08-10-1996
		CA 2214359 A	26-09-1996
		EP 0815261 A	07-01-1998
		WO 9629431 A	26-09-1996
		US 5691141 A	25-11-1997
		AU 5992994 A	15-08-1994
		CA 2153387 A	21-07-1994
		EP 0679196 A	02-11-1995
		JP 8509857 T	22-10-1996
		WO 9416101 A	21-07-1994

Form PCT/ISA210 (patent family annex) (July 1992)